



**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA |
DEPARTAMENTO DE FÍSICA Y QUÍMICA**

**TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS
ACOPLADAS A ESPECTROMETRÍA DE
MASAS DE BAJA Y ALTA RESOLUCIÓN
APLICADAS AL ANÁLISIS DE
CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN
SEGURIDAD ALIMENTARIA Y CONTROL
AMBIENTAL**

NOELIA M^A VALERA TARIFA

ALMERÍA, JULIO 2020





UNIVERSIDAD
DE ALMERÍA

TESIS DOCTORAL

**TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS ACOPLADAS A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE BAJA Y ALTA
RESOLUCIÓN APLICADAS AL ANÁLISIS DE
CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN SEGURIDAD
ALIMENTARIA Y CONTROL AMBIENTAL**

***CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES COUPLED TO LOW
AND HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY
APPLIED TO THE ANALYSIS OF ORGANIC POLLUTANTS
IN FOOD SAFETY AND ENVIRONMENTAL CONTROL***

Programa de Doctorado en Química Avanzada

*Memoria presentada por Noelia M^a Valera Tarifa para optar al
grado de Doctor en Ciencias Químicas*

Fdo. Noelia M^a Valera Tarifa

Directora de Tesis

Codirector de tesis

Fdo. Dra. Antonia
Garrido Frenich

Fdo. Dr. José Luis
Martínez Vidal

Almería, 2020

A mis padres

*“You cannot get through a single day
without having an impact on the world around you.
What you do makes a difference, and you have to decide
what kind of difference you want to make.”*

(Jane Goodall, científica británica, 1984)

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

La autora de la presente Tesis agradece al Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO-FEDER) por la financiación recibida a través del proyecto Ref. AGI2010-21370 y al Ministerio Regional de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (proyecto Ref. P-12-FQM 1838). Asimismo, la autora agradece al Grupo de Investigación Química Analítica de Contaminantes y al Laboratorio Analítico Bioclínico (LAB) por el soporte personal y económico.

AGRADECIMIENTOS

Después de casi diez años, mi etapa en el Doctorado llega a su fin. Finalmente, y aunque no exenta de pausas, y momentos difíciles de duda e incertidumbre sobre su continuidad, esta Tesis ha ido progresivamente tomando forma hasta constituir una realidad material. Por fin. Y para poner punto y final a esta etapa, tengo que empezar por agradecer desde el principio a todas aquellas personas que han formado parte de ella, y en cierto modo, de mi vida, durante todos estos años.

Como punto de partida, quiero agradecer a mi directora y co-director de Tesis, Toñi y José Luis, por darme la oportunidad de llevarla a cabo. Gracias Toñi por brindarme la posibilidad de entrar a formar parte del grupo de investigación Química Analítica de Contaminantes hace diez años, justo cuando acaba de terminar la carrera y mi futuro no era sino un camino incierto pendiente aún de definir. La aceptación de este ofrecimiento trajo consigo un importante período de aprendizaje personal y profesional e impulsó el inicio de mi carrera laboral hasta conducirme a mi situación actual.

Aterrizando en el presente, agradecer a mis compañeros de LAB (somos muchos para nombrar), y especialmente a los de cromatografía, porque, al fin y al cabo, al final de la semana pasamos más tiempo juntos, trabajando y haciendo equipo, que con nuestras propias familias: Antonio, Sonia, Fran, Charo, Juan Carlos, Rosa, Cintia, M^a del Mar, Nieves, Juan Alberto, Noe, Ana,...(espero no dejarme a nadie) y a las últimas incorporaciones, José Raúl, Álvaro, José Antonio, Jesús...ya mismo dejaré de hablaros de la Tesis... Porque por mucho trabajo que tengamos, también hay huecos para risas y buenos momentos que hacen más llevadera una jornada laboral por dura que sea, y eso se agradece.

Gracias Noe, por darme consejos y ánimos todos estos años de amistad, en la carrera, en el Doctorado y en el trabajo, combatiendo mis predicciones *realistas* (o pesimistas como me rebatirías tú) con tu actitud positiva. Junto con Matu y otros compañeros, hicimos buen equipo en la carrera, y eso me ayudó a hacerle frente y terminarla, justo cuando empezaba a cuestionarme lo acertado de mi decisión de estudiar Química. Sin duda, diez años después no me arrepiento.

A mis mejores amigas, Lucía y Bea, porque van ya por lo menos veinte años de amistad compartida, y sé que serán muchos más... Con vosotras tengo la certeza de que es verdad eso que dicen de que los buenos amigos son aquellos miembros de la familia que hemos tenido la posibilidad de elegir nosotros mismos. Y a sus parejas, Paco y Franci, que con el tiempo han dejado de ser conocidos para convertirse en amigos... A Estrella y Lorena, que pese a la distancia, siguen siendo buenas amigas y sé que seguiremos buscando buenos momentos para compartir... A todos vosotros, amig@s, os doy las gracias por acompañarme en este camino y os dedico también esta Tesis. Espero que todo esto del Covid-19 pase pronto y podamos retomar el contacto en persona.

A mi tía Encarni, porque siempre ha sido una persona importante en mi vida, y no pierdo la esperanza de que el tiempo ponga todo en su lugar y las cosas se solucionen algún día. Porque, sinceramente, yo creo que la familia es una de las cosas más importantes en esta vida, pese a los obstáculos y las circunstancias que nos rodean.

Por supuesto, a mis hermanas, Bea y Claudia. Una infancia compartida con hermanas tiene un encanto especial, pese a las peleas y discrepancias continuas, con reconciliaciones inmediatas. Ánimo y terminad los estudios ya, que os queda un suspiro...y nos quedan muchos viajes que emprender.

Pero sobre todo, a mis padres. Porque sé que a veces los hijos no agradecemos lo suficiente todo lo que hacéis por nosotros pensando únicamente en nuestro bienestar. Porque la persona que soy, es gracias a vosotros, y si estoy dónde estoy, es por vuestro inestimable apoyo y enseñanza todos estos años. Por eso, y por mucho más que con palabras es difícil describir, os dedico esta Tesis.

El punto y final de una etapa y el principio del comienzo de una nueva...

El principal objetivo de la presente Tesis es el desarrollo y validación de métodos analíticos rápidos y fiables para la determinación de contaminantes en muestras alimentarias y ambientales mediante técnicas cromatográficas acopladas a analizadores de espectrometría de masas de baja resolución (LRMS). Se pretende que los métodos optimizados sean aplicables en laboratorios de análisis en rutina, y que se adapten a las exigencias del marco normativo actual. Asimismo, como segundo objetivo se ha pretendido estudiar la capacidad de la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), siguiendo las tendencias actuales en análisis de contaminantes.

Para llevar a cabo ambos objetivos, la Tesis se divide en dos grandes bloques conforme a la naturaleza de las matrices estudiadas. En este sentido, el primer bloque incluye los trabajos relacionados con la *seguridad alimentaria*, mientras que el segundo los relacionados con el *control ambiental*.

El primer bloque de *seguridad alimentaria* está enfocado al análisis de residuos de contaminantes en muestras alimentarias mediante cromatografía de líquidos de ultra alta presión (UHPLC) acoplada a LRMS. Le corresponden los siguientes estudios:

- Determinación de cuatro metabolitos de nitrofuranos en productos del mar mediante UHPLC acoplada a espectrometría de masas en tándem (MS/MS).
- Desarrollo y validación de un método de análisis de 250 plaguicidas en frutas procesadas mediante UHPLC-MS/MS.

El segundo bloque de *control ambiental* está dedicado al análisis de contaminantes orgánicos en muestras ambientales mediante

cromatografía de gases (GC) acoplada a LRMS y HRMS. Aquí se han llevado a cabo los siguientes estudios:

- Revisión bibliográfica del “estado del arte” del análisis de los contaminantes orgánicos persistentes (POPs) en muestras de agua y sedimentos mediante GC-HRMS.
- Desarrollo y validación de un método de análisis de 12 hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en distintos tipos de agua (de consumo, residual, de agua de mar y continental no tratada) mediante GC-MS/MS.

En términos generales, la presente Tesis titulada “*Técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas de baja y alta resolución aplicadas al análisis de contaminantes orgánicos en seguridad alimentaria y control ambiental*”, se centra en la aplicabilidad de las técnicas de UHPLC y GC utilizando analizadores de LRMS y HRMS para el análisis de contaminantes en muestras alimentarias y ambientales. Con este propósito se han desarrollado, optimizado y validado métodos de análisis simples, fiables y rápidos para su aplicación en análisis de rutina mediante técnicas cromatográficas acopladas a LRMS. Asimismo, se ha incluido una revisión bibliográfica sobre las últimas tendencias en el análisis de contaminantes utilizando GC-HRMS en el ámbito medioambiental.

En la parte de seguridad alimentaria se han desarrollado dos métodos analíticos para la determinación de metabolitos de nitrofuranos (fármacos antibacterianos de amplio espectro) en productos del mar y de residuos de plaguicidas en frutas procesadas mediante UHPLC-MS/MS. En ambos trabajos se ha optimizado el procedimiento de extracción y limpieza (en el caso de los nitrofuranos) y las condiciones instrumentales para la separación cromatográfica y la detección de los analitos. Se ha tratado además de tener en consideración la legislación vigente para los dos tipos de contaminantes a nivel europeo: la prohibición de los nitrofuranos en productos de la acuicultura y el establecimiento de un límite mínimo de funcionamiento exigido (MRPL) de 1 µg/kg, así como los estrictos límites máximos de residuos (LMRs) para plaguicidas en frutas frescas (no existen LMRs establecidos específicamente para la fruta procesada). Adicionalmente,

los métodos desarrollados han sido completamente validados en términos de sensibilidad, selectividad, exactitud, precisión y robustez a fin de verificar su aplicabilidad en el análisis de muestras en rutina y garantizar la fiabilidad de los resultados. Finalmente, ambas metodologías han sido aplicadas al análisis de muestras alimentarias reales.

Los trabajos que se incluyen en este primer bloque son los siguientes:

- Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación simultánea de cuatro metabolitos de nitrofuranos en productos del mar mediante UHPLC-MS/MS. Destacar que el procedimiento de extracción consistió en una hidrólisis ácida y derivatización simultáneas, seguida por una etapa final de limpieza mediante extracción en fase sólida (SPE). La aplicación de la técnica de UHPLC permitió reducir el tiempo de análisis cromatográfico considerablemente (5,5 min) e incrementar la sensibilidad, con el objetivo de lograr límites de cuantificación (LOQs) iguales o inferiores a los MRPLs establecidos por la Unión Europea (UE). El método fue aplicado al análisis de muestras reales, pero no se detectaron residuos de nitrofuranos.
- Desarrollo y validación de un método analítico multiresiduo fiable para la determinación simultánea de 250 plaguicidas en frutas procesadas con un tiempo total de análisis de 16 minutos mediante UHPLC-MS/MS. La extracción se llevó a cabo aplicando un método QuEChERS (acrónimo de rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro) modificado, sin ninguna etapa de limpieza, pero incluyendo una etapa de dilución final para obtener una mejor forma de pico cromatográfico y reducir el efecto matriz. Finalmente, el método desarrollado fue aplicado al análisis en rutina de 103 muestras de distintos tipos de frutas procesadas

(purés, purés concentrados, mermelada, pulpa y fruta en almíbar), detectándose la presencia de varios residuos de plaguicidas como fluopiram, espinosad o ciprodinilo.

En el segundo bloque de control ambiental, se abordó el estudio de contaminantes ubicuos y tóxicos (procedentes mayoritariamente de fuentes industriales y antropogénicas) en muestras medioambientales, considerando las familias de los contaminantes POPs y la de los PAHs. Los trabajos publicados dentro de este bloque son los siguientes:

- Revisión bibliográfica de las metodologías analíticas empleadas entre los años 2005-2013 para la determinación de los POPs en muestras de agua y sedimentos. Esta revisión incluye los métodos de extracción y limpieza aplicados, así como las técnicas cromatográficas de GC y de detección mediante HRMS. Engloba además la aplicación de estas técnicas de GC-HRMS y las estrategias de cuantificación en muestras reales.
- Desarrollo de un método de análisis sensible para la determinación de 12 PAHs (definidos como prioritarios por la UE y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos) en agua, utilizando GC-MS/MS y con el objetivo de alcanzar unos LOQs lo suficientemente bajos para cumplir con la legislación actual. El tratamiento de las muestras se basó en un procedimiento de extracción en fase sólida (SPE). Adicionalmente, el método fue validado en cuatro tipos de agua diferentes: agua de mar, de consumo, continental no tratada y residual. Y finalmente, fue aplicado al análisis en rutina de muestras acuosas, aunque no se detectó la presencia de PAHs por encima del LOQ.

In general terms, this Thesis entitled “*Chromatographic techniques coupled to low and high resolution mass spectrometry applied to the analysis of organic contaminants in food safety and environmental control*”, has been focused on the applicability of ultra-high liquid chromatography (UHPLC) and gas chromatography (GC) using low resolution (LRMS) and high resolution mass spectrometry (HRMS) analyzers for the analysis of contaminants in food and environmental samples. With this purpose, simple, reliable and rapid analytical methods using chromatographic techniques coupled to LRMS have been developed, optimized and validated for routine analysis. Likewise, a bibliographic review about last tendencies in the analysis of contaminants by GC-HRMS in the environmental field has been included.

Therefore, depending on the nature of analyzed matrix, this Thesis is divided in two main sections for the determination of contaminants: *i*) food safety, focused on the applicability of UHPLC coupled to MS in tandem (MS/MS); and *ii*) environmental control, where GC-MS/MS and GC-HRMS are applied.

In the first section of food safety, two analytical methods have been developed for the determination of nitrofurans metabolites (broad-spectrum antibacterial drugs) in seafood and residues of pesticides in processed fruits by UHPLC-MS/MS. Extraction and clean-up (in the case of nitrofurans) procedures, as well as instrumental conditions for the chromatographic separation and detection of the analytes have been optimized in both works. Besides, current legislation in Europe Union (EU) was taken into account: the prohibition of nitrofurans in products of aquaculture and the establishment of a minimum required

performance limit of 1 µg/kg (MRPL), as well as existing strict maximum limits of residues (MLRs) for pesticides in fresh fruits (MLRs have not been specifically established for processed fruit). Additionally, developed methods have been fully validated in terms of sensitivity, selectivity, accuracy and robustness in order to verify its applicability in routine analysis of samples and to ensure the reliability of results. Finally, both methodologies have been applied to the analysis of real food samples.

Therefore, studies which have been included in this first section are listed below:

- Development and validation of an analytical method for the simultaneous determination of 4 nitrofurans metabolites in seafood by UHPLC-MS/MS. The extraction procedure was based on a simultaneous acidic hydrolysis and derivatization followed by a final step of clean-up by solid-phase extraction (SPE). The use of the UHPLC technique allowed reducing the time consumed during the chromatography analysis (5.5 min). It also increased the sensitivity, with the objective of obtaining equal or lower quantification limits (LOQs) than the MRPLs established by the EU. The method was applied to real food samples, but nitrofurans were not found.
- Development and validation of a reliable multiresidue analytical method for the simultaneous determination of 250 pesticides in processed fruit in a 16-min run by UHPLC-MS/MS. Extraction was performed applying a modified QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) method without any clean-up step but including a dilution stage in order to obtain good peak shapes and reducing matrix effects. Finally, the developed method was applied to the routine analysis of 103 samples of different types

of processed fruits (puree, concentrated puree, jam, pulp and fruit in syrup), detecting the presence of several pesticides residues such as fluopyram, spinosad or cyprodinil.

The second section of environmental control was focused on the study of two families of ubiquitous and toxic contaminants (from industrial and anthropogenic sources) in environmental samples: persistent organic pollutants (POPs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). In this context, published studies in this section are listed below:

- Bibliographic review of analytical methodologies used between 2005 and 2013 for the determination of POPs in water and sediments samples. This review includes extraction and cleaning methods, as well as the “state of art” of GC and HRMS techniques in this context. It also includes GC-HRMS applications and quantification strategies of real samples.
- Development of a sensitive analytical method for the determination of 12 PAHs (defined as priority pollutants by the EU and the United States Environmental Protection Agency), using GC-MS/MS. The main objective was achieving LOQs low enough according to the requirements of current legislation. The sample treatment was based on a SPE method. Additionally, the method was validated to ensure the reliability of results in four different types of water: seawater, drinking water, untreated inland water and wastewater. And finally, it was applied to routine analysis of aqueous samples, although PAHs above LOQs were not detected.

PUBLICACIÓN QUE AVALA LA TESIS

✓ *Development and full validation of a multiresidue method for the analysis of a wide range of pesticides in processed fruit by UHPLC-MS/MS.*

N. M. Valera-Tarifa, R. Santiago-Valverde, E. Hernández-Torres, J. L. Martínez-Vidal, A. Garrido-Frenich, *Food Chemistry*, 315 (2020) 126304.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AA-EQS: Promedio anual de los estándares de calidad ambiental

ACN: Acetonitrilo

AcOEt: Acetato de etilo

ADI: Ingesta diaria aceptable

AECOSAN: Agencia española de consumo, seguridad alimentaria y nutrición

AHD: 1-aminohidantoin

AINS: Antiinflamatorios no esteroideos

AMOZ: 3-amino-5-morfolinometil-1,3-oxazolidinona

ANT: Antraceno

AOAC: Asociación oficial de químicos analíticos

AOZ: 3- amino-2-oxazolidinona

APCI: Ionización química a presión atmosférica

API: Ionización a presión atmosférica

BaA: Benzo[*a*]antraceno

BaP: Benzo[*a*]pireno

BbFA: Benzo[*b*]fluoranteno

BcL: Benzo[*c*]fluoreno

BDE: Bromodifeniléter

BDE-209: Decabromodifenil éter

BfR: Instituto para la evaluación del riesgo de Alemania

BghiP: Benzo[ghi]perileno

BjFA: Benzo[j]fluoranteno

BkFA: Benzo[k]fluoranteno

C8: Octilsílice

C18: Octadecilsílica u octadecilsilano

CCDR: Comité del Codex sobre residuos de plaguicidas

CCRVDF: Comité del Codex sobre residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos

CC α : Límite de decisión

CC β : Capacidad de detección

CDF: Clorodibenzofurano

CE: Comunidad europea

CE: Energía de colisión

CEE: Comunidad económica europea

CFR: Código de regulaciones federales

CL₅₀: Concentración letal media

CRLs: Laboratorios de referencia comunitarios

CRM: Material de referencia certificado

CW/DVB: Carbowax/divinilbenceno

CXP: Potencial de salida de la celda de colisión

DAD: Detección por diodo array

DBahA: Dibenzo[*a,h*]antraceno

DCM: Diclorometano

DDA: Dosis diaria admisible

DDT: Dicloro difenil tricloroetano

DL₅₀: Dosis letal media

DLLME: Microextracción dispersiva líquida-líquida

***d*-PCBs:** Bifenilos policlorados similares a las dioxinas

***d*-SPE:** Extracción dispersiva en fase sólida

DP: Potencial de reducción

DVB: Divinilbenceno

ECD: Detector de captura de electrones

eCFR: Código electrónico de regulaciones federales

EFSA: Autoridad europea de seguridad alimentaria

EI: Ionización electrónica o impacto electrónico

ENAC: Agencia Española de Acreditación y Certificación

EP: Potencial de entrada

EPA: Agencia de protección ambiental

EQS: Estándares de calidad ambiental, también conocidos como normas de calidad ambiental, NCA

ESI: Ionización por electrospray

FA: Fluoranteno

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación

FDA: Administración de alimentos y medicamentos

FFDCA: Ley federal de alimentos, medicamentos y cosméticos

FID: Detector de ionización de llama

FLD: Detector de fluorescencia

FTD: Furaltadona

FZD: Furazolidona

GAP: Buenas Prácticas Agrícolas

GC: Cromatografía de gases

GC × GC: Cromatografía de gases bidimensional

GCB: Carbón negro grafitizado

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

GMP: Buenas prácticas de fabricación

GPC: Cromatografía por exclusión o de permeación en gel

CRM: Material de referencia certificado

GS1: Gas nebulizador

GS2: Gas de secado o calentador de la fuente de iones

HBB: Hexabromobifenilo

HBCD: Hexabromociclododecano

HCB: Hexaclorobenceno

HCH: Hexaclorociclohexano

HCBD: Hexaclorobutadieno

HF-LPME: Microextracción en fase líquida en fibra hueca

HN: 2-Hidroxi-1-naftaldehído

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficacia

HRMS: Espectrometría de masas de alta resolución

HRTOF-MS: Espectrometría de masas de alta resolución con analizador de tiempo de vuelo

HS-SPME: Microextracción en fase sólida en espacio-cabeza

HSTOF-MS: Espectrometría de masas de alta velocidad con analizador de tiempo de vuelo

IARC: Agencia internacional para la investigación del cáncer

IP: Indeno[1,2,3-*cd*]pireno

IPs: Puntos de Identificación

IS: Estándar interno

ISO: Organización internacional de normalización

JECFA: Comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios

JMPR: Reunión conjunta FAO/OMS sobre residuos de plaguicidas

LC: Cromatografía de líquidos

LC-MS: Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas

LC-MS/MS: Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem

LDPE: Polietileno de baja densidad

LLE: Extracción líquido-líquido

LMR: Límite máximo de residuos

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

LPME: Microextracción en fase líquida

LRMS: Espectrometría de masas de baja resolución

LVI: Inyección de grandes volúmenes

MAE: Extracción asistida por microondas

MCH: 5-metilcriseno

MDL: Límites de detección del método

MeOH: Metanol

MEPS: Microextracción con sorbentes empaquetados

MID: Detección de ion múltiple

MIL: Líquido magnético iónico

MRM: Monitorización de reacciones múltiples

MRPL: Límite de funcionamiento mínimo exigido.

MS: Espectrometría de masas

MS/MS: Espectrometría de masas en tándem

MWCNTs: Nanotubos de carbono de pared múltiple

***m/z*:** Relación masa-carga

2-NBA: 2-nitrobenzaldehído

NFT: Nitrofurantoína

NFZ: Nitrofurazona

NP: Nitrofenil derivados

NPH: Naftaleno

NRLs: Laboratorios de referencia nacionales

NTA: 2-Naftaldehído

OCP: Plaguicida organoclorado

OMS: Organización mundial de la salud

PA: Poliacrilato

PAHs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos

PBBs: Bifenilos polibromados

PBDEs: Difeníléteres bromados

PCB: Bifenilos policlorados

PCCC C₁₀-C₁₃: Cloroalcanos de cadena corta

PCDD/Fs: Dienzo-*p*-dioxinas policloradas (dioxinas) y dibenzofuranos policlorados (furanos)

PCN: Naftalenos policlorados

PCP: Pentaclorofenol

PDMS: Polidimetilsiloxano

PeCB: Pentaclorobenceno

PFHxS: Ácido perfluorohexano-1-sulfónico

PFOA: Ácido pentadecafluorooctanoico

PFOS: Ácido perfluorooctano sulfónico

PGC: Carbón poroso grafitizado

PLE: Extracción con líquidos presurizados.

PNUMA / UNEP: Programa de las Naciones Unidas para el medio ambiente

POPs: Contaminantes orgánicos persistentes

PSA: Amina primaria/secundaria

PTV: Vaporización a temperatura programada

Q: Cuadrupolo

QLT: Trampa de iones de cuadrupolo lineal

QqQ: Triple cuadrupolo

QTOF: Analizador de tiempo de vuelo con un cuadrupolo híbrido

QuEChERS: Acrónimo de rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro – del inglés *Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust and Safe*

RASFF: Sistema de alerta rápida para alimentos y piensos

RFLs: Laboratorios de rutina y/o campo

RL: Límite informado

RSD: Desviación estándar relativa

RT: Tiempo de retención

Rt: Tiempo de retención medio del analito

Rt_{is}: Tiempo de retención medio del estándar interno

Rt: Tiempo de retención relativo promedio

RTW: Ventana de tiempo de retención

SBDLME: Microextracción dispersiva líquida de barras magnéticas agitadoras

SBME: Microextracción en modo barra de solvente

SBSE: Extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras

SD: Desviación estándar

SDME: Microextracción en gota

SEM: Semicarbazida

SIM: Monitorización de iones seleccionados

SLE: Extracción sólido-líquido

sMRM: modo MRM (monitorización de reacciones múltiples) programado

S/N: Relación señal/ruido

SPE: Extracción en fase sólida

SPMD: Dispositivos de membrana semipermeable

SPME: Microextracción en fase sólida

SRM: Monitorización de reacciones seleccionadas

sSRM: Algoritmo de SRM programado

TCDD: Tetraclorodibenzo-*p*-dioxina

TD: Desorción térmica

TDU: Unidad de desorción térmica

TEF: Factor de equivalencia tóxica

TEM: Temperatura de la fuente

TEQ: Equivalentes tóxicos internacionales

TIC: Cromatograma total de iones

TOF: Tiempo de vuelo

TPP: Fosfato de trifenilo

U: Incertidumbre expandida

UE: Unión europea

UHPLC: Cromatografía de líquidos de ultra alta presión

US: Estados Unidos

US-EPA: Agencia de protección ambiental de Estados Unidos

UV: Ultravioleta

WFD: Directiva marco del Agua

Z-Sep: Sorbente basado en dióxido de zirconio

<u>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</u>	1
1. CONTEXTUALIZACIÓN	3
2. SEGURIDAD ALIMENTARIA	6
2.1. <i>ACUICULTURA Y MEDICAMENTOS VETERINARIOS</i>	7
2.2. <i>FRUTAS PROCESADAS Y PLAGUICIDAS</i>	9
3. CONTROL AMBIENTAL: AGUA Y SEDIMENTOS	11
4. ANALITOS	13
4.1. <i>SEGURIDAD ALIMENTARIA</i>	13
4.1.1. Nitrofuranos.....	13
4.1.2. Plaguicidas.....	16
4.2. <i>CONTROL AMBIENTAL</i>	21
4.2.1. Contaminantes Orgánicos Persistentes.....	21
4.2.2. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.....	27
5. NORMATIVA VIGENTE	29
5.1. <i>SEGURIDAD ALIMENTARIA</i>	29
5.1.1. Nitrofuranos.....	31
5.1.2. Plaguicidas.....	38
5.2. <i>CONTROL AMBIENTAL</i>	40

6. TRATAMIENTO DE MUESTRA	45
<i>6.1. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN EN MUESTRAS ALIMENTARIAS</i>	46
6.1.1. Nitrofuranos en productos del mar.....	47
6.1.2. Plaguicidas en frutas procesadas.....	53
<i>6.2. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN EN MUESTRAS AMBIENTALES</i>	58
6.2.1. Contaminantes orgánicos persistentes en muestras de agua..	61
6.2.2. Contaminantes orgánicos persistentes en muestras de sedimentos.....	71
7. TÉCNICAS DE ANÁLISIS	79
<i>7.1. NITROFURANOS Y PLAGUICIDAS EN MUESTRAS ALIMENTARIAS</i>	79
7.1.1. Cromatografía de líquidos.....	79
7.1.2. Técnicas de detección.....	90
<i>7.2. CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES EN MUESTRAS AMBIENTALES</i>	94
7.2.1. Cromatografía de gases.....	94
7.2.2. Técnicas de detección.....	103
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

CAPÍTULO II. SEGURIDAD ALIMENTARIA:

Determinación de contaminantes en muestras alimentarias mediante UHPLC-MS/MS.....	123
1. INTRODUCCIÓN.....	125
2. DETERMINACIÓN DE LOS METABOLITOS DE NITROFURANOS EN PRODUCTOS DEL MAR MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ULTRA ALTA PRESIÓN ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TRIPLE CUADRUPOLO	129
2.1. INTRODUCCIÓN.....	129
2.2. EXPERIMENTAL.....	132
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	139
2.4. CONCLUSIONES.....	150
2.5. REFERENCIAS.....	151
3. DESARROLLO Y VALIDACIÓN COMPLETA DE UN MÉTODO MULTIRRESIDUO PARA EL ANÁLISIS DE UN AMPLIO RANGO DE PLAGUICIDAS EN FRUTAS PROCESADAS MEDIANTE UHPLC-MS/MS	154
3.1. INTRODUCCIÓN.....	154
3.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	157
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	163
3.4. CONCLUSIONES.....	190
3.5. REFERENCIAS.....	191

<i>ANEXO I: Condiciones de detección de los plaguicidas analizados en fruta procesada.....</i>	<i>193</i>
--	------------

<u>CAPÍTULO III. CONTROL AMBIENTAL: Determinación de contaminantes en muestras ambientales mediante GC-LRMS y GC-HRMS.....</u>	213
1. INTRODUCCIÓN.....	215
2. APLICACIONES ACTUALES DE GC-(Q)TOF Y GC-HRMS PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES EN MUESTRAS DE AGUA Y SEDIMENTOS.....	218
<i>2.1. INTRODUCCIÓN.....</i>	<i>218</i>
<i>2.2. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS.....</i>	<i>222</i>
<i>2.3. ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN (GC-HRMS).....</i>	<i>235</i>
<i>2.4. APLICACIONES Y ESTRATEGIAS DE CUANTIFICACIÓN.....</i>	<i>243</i>
<i>2.5. CONCLUSIONES.....</i>	<i>245</i>
<i>2.6. REFERENCIAS.....</i>	<i>247</i>
3. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO MEDIANTE GC-MS/MS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	

PRIORITARIOS EN DIFERENTES TIPOS DE AGUA.....	250
3.1 <i>INTRODUCCIÓN.....</i>	<i>250</i>
3.2 <i>MATERIALES Y MÉTODOS.....</i>	<i>253</i>
3.3 <i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</i>	<i>257</i>
3.4 <i>CONCLUSIONES.....</i>	<i>268</i>
3.5 <i>REFERENCIAS.....</i>	<i>269</i>
ANEXO II: <i>Material suplementario del análisis de PAHs en agua.....</i>	273

<u>CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO.....</u>	283
1. CONCLUSIONES.....	285
2. PERSPECTIVAS DE FUTURO.....	286
ANEXO III: <i>Otras aportaciones científicas.....</i>	287

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN



1. CONTEXTUALIZACIÓN

El desarrollo tecnológico, junto con el crecimiento de la economía y de la población mundial, ha sido una tendencia continuada a nivel global durante las últimas décadas. Esto ha llevado a la producción y utilización de una cantidad y variedad cada vez mayor de compuestos químicos con el fin de mejorar nuestra calidad de vida y satisfacer las necesidades económicas. Como consecuencia, una amplia gama de compuestos orgánicos y contaminantes están apareciendo en los alimentos y en el medio ambiente, con el consecuente y preocupante riesgo que esto implica para la salud humana. Algunas de las principales fuentes de contaminación aparecen reflejadas en la **Figura 1.1**.

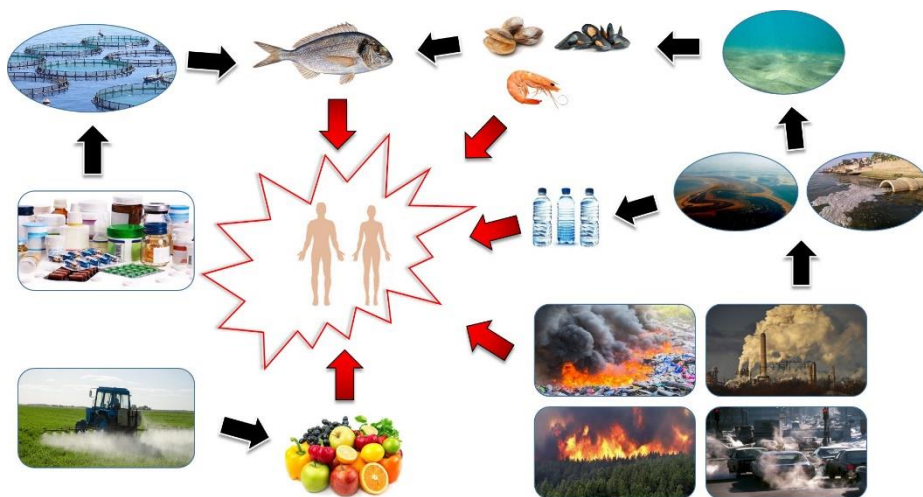


Figura 1.1. *Representación gráfica genérica de las posibles fuentes de contaminación ambiental y alimentaria de la sociedad actual que afectan al ser humano.*

En este punto, es preciso discernir entre los conceptos de “residuo” y “contaminante”. Se define “residuo” como aquella sustancia cuya presencia en los alimentos o en el medio ambiente es consecuencia de su aplicación intencionada con algún fin concreto (**Figura 1.1**). Este es el

caso, por ejemplo, de los plaguicidas aplicados en la producción de frutas y hortalizas y cuyos residuos pueden aparecer en los alimentos de origen vegetal que llegan al consumidor, incluso en el caso de ser procesados. Asimismo, residuos de medicamentos veterinarios pueden estar presentes en los alimentos de origen animal, como sucede en el caso de los productos del mar procedentes de la acuicultura. Por otro lado, el término “contaminante”, engloba aquellas sustancias que no han sido aplicadas de forma intencionada en ninguna actividad humana, sino que se han generado a partir de procesos naturales o derivados de las propias actividades antropogénicas ⁽¹⁾. Por ejemplo, contaminantes ambientales de las aguas y los sedimentos como son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y algunos contaminantes orgánicos persistentes. Éstos últimos pueden generarse durante la combustión incompleta de la materia orgánica (madera, combustibles fósiles, etc.), o proceder de las emisiones de los vehículos de motor (**Figura 1.1**). No obstante, por cuestiones de simplificación, en la mayoría de las ocasiones en la presente Tesis nos referiremos a ambos, contaminantes y residuos, con el término genérico de “contaminante”. Todo esto ha generado una preocupación creciente durante los últimos años acerca de la seguridad alimentaria y ambiental, cuya garantía es un objetivo prioritario indiscutible e imprescindible en la sociedad actual. Ello se soporta en la existencia de una estricta legislación con el objeto de regular, minimizar y someter a control la presencia de contaminantes en el medio ambiente y en los alimentos. En este contexto, la investigación en el ámbito analítico tiene como objetivo principal el desarrollo de herramientas eficientes que permitan mejorar la capacidad de detección y cuantificación de residuos y contaminantes

orgánicos en matrices alimentarias y ambientales, aportando métodos analíticos sensibles, reproducibles y fiables.

Asimismo, resulta de vital importancia la disponibilidad de laboratorios de análisis de rutina preparados y acreditados de acuerdo a normas internacionales, como las normas ISO (Organización Internacional de Normalización). Éstos deben ser capaces de realizar análisis complejos y contar con un equipamiento analítico avanzado (analizadores de masas acoplados a sistemas cromatográficos adecuados) que les permita garantizar resultados fiables en el análisis de residuos de plaguicidas, medicamentos veterinarios y otros contaminantes en el sector alimentario y medioambiental. Es preciso destacar que, estos laboratorios de análisis juegan un papel fundamental en el desarrollo socio-económico y en el comercio internacional, permitiendo la exportación e importación segura de alimentos, y contribuyendo además de forma notable al incremento del nivel científico-tecnológico de la sociedad.

En este contexto se desarrolla la presente Tesis Doctoral, que se divide en dos grandes bloques: Seguridad Alimentaria y Control Ambiental. El primero se focaliza en el desarrollo de métodos de análisis para residuos de un grupo específico de medicamentos veterinarios y plaguicidas en productos del mar y frutas procesadas, respectivamente. El segundo bloque, ofrece una visión global y aporta el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de compuestos orgánicos persistentes en el medio ambiente, específicamente en agua y sedimentos. En ambos bloques, se parte de las estrategias analíticas disponibles y del marco legislativo establecido para los compuestos objeto de estudio a fin de intentar una mejora en el “estado del arte” de los métodos de análisis.

2. SEGURIDAD ALIMENTARIA

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) define la **Seguridad Alimentaria** como “el acceso material y económico de todos los miembros de la población en todo momento a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimenticias y llevar una vida activa y sana” (2).

Algunos de los factores que pueden afectar a la seguridad alimentaria son el comercio mundial, el desarrollo socio-económico, tecnológico e industrial y las nuevas prácticas agrícolas. A ello se une la necesidad ineludible de abastecer de alimentos a una población mundial en continuo crecimiento, que se espera alcance alrededor de 9 mil millones para 2050 según la estimación de las Naciones Unidas. Este crecimiento probablemente vaya acompañado por enfrentamientos a nivel global por acceder a los recursos disponibles y un creciente estrés sobre los ecosistemas (3,4). Como consecuencia de esta elevada demanda alimentaria, la mayoría de los sistemas de producción de alimentos se basarán en métodos intensivos de cultivos y de cría de animales destinados al consumo, cambios que se producen ya desde hace algunas décadas. Esto se traduce en el uso de piensos formulados que contienen antibióticos y en la aplicación masiva de plaguicidas a los cultivos para mejorar el rendimiento y evitar pérdidas económicas (5), lo que implica a su vez un incremento de la probabilidad de que residuos de estas sustancias tóxicas persistan en los productos alimenticios y en el medio ambiente.

Por todo ello, tanto la seguridad como la calidad alimentaria han ido ganando atención por parte de los consumidores, los gobiernos y los productores de alimentos durante las últimas décadas. Además, al tratarse de una cuestión de salud pública, la presencia de sustancias

peligrosas y tóxicas también puede repercutir negativamente en la economía, pudiendo limitar o reducir la comercialización de productos alimenticios en mercados nacionales o internacionales. Por esta razón, el control de residuos y contaminantes es uno de los problemas de mayor importancia en la seguridad alimentaria, y organismos, tanto públicos como privados, llevan a cabo destacables esfuerzos para monitorizarlos mediante análisis químicos (6) y minimizar el riesgo.

2.1. ACUICULTURA Y MEDICAMENTOS VETERINARIOS

La acuicultura es el “cultivo” de organismos acuáticos tanto en zonas costeras como de interior que supone intervenciones, entre otras, en el proceso de cría para aumentar la producción (7). Es, probablemente, el sector de producción de alimentos de más rápido crecimiento y en la actualidad representa casi el cincuenta por ciento de los productos del mar destinados a la alimentación a nivel mundial (4). Aunque el cultivo de especies marinas tiene su origen en civilizaciones antiguas y ha sido una práctica perpetuada a lo largo de los años, durante el pasado siglo XX se produjo un elevado incremento en la demanda de productos del mar (8,9). Ello condujo a la sobreexplotación y consecuente agotamiento de las reservas naturales de pescado, surgiendo la necesidad de intensificar las prácticas de acuicultura. Los métodos de cría intensiva se basan en un alto *stock* en densidad y volumen, lo que trae consigo un entorno con condiciones favorables para el desarrollo de infecciones y enfermedades (10). En consecuencia, ha surgido desde hace algún tiempo la necesidad del uso intensivo de antibióticos, antifúngicos y otros medicamentos, que se administran mediante diversas vías, como por ejemplo formulados en el pienso, en pellets o a través del agua (8). Los antibióticos, en particular, son un grupo de compuestos naturales o sintéticos que son capaces de destruir bacterias (bactericidas) o de

inhibir su crecimiento (bacteriostáticos) (8), y que han sido usados en acuicultura principalmente para tratar y prevenir enfermedades como agentes terapéuticos y profilácticos, respectivamente (9). De hecho, el uso global de agentes antimicrobianos en animales destinados al consumo, incluyendo acuicultura, se está viendo incrementado de forma notable, estimado en unas 63 mil toneladas en 2010, y con una previsión de que aumente un 67% en 2030 (10). Aunque el pescado es considerado un alimento rico en grasas insaturadas, que aporta múltiples beneficios para la salud al proteger frente a enfermedades cardiovasculares y contribuir a dietas equilibradas contra la obesidad, residuos de medicamentos veterinarios pueden estar presentes en el pescado y marisco que se comercializa. Estos residuos pueden representar un riesgo potencial para la salud de los consumidores, ya que pueden ser intrínsecamente tóxicos, producir reacciones de hipersensibilidad alérgica o inducir resistencia antimicrobiana (11,12). De hecho, su presencia ha generado alertas en el ámbito de la seguridad alimentaria relacionadas con la calidad del producto piscícola. Asimismo, el impacto medioambiental relacionado con la dispersión de las sustancias químicas y los medicamentos en agua y sedimentos, al igual que sus efectos sobre las comunidades acuáticas (13), ha ido sumando importancia con el transcurso de los años. Por ejemplo, el uso no regulado de antibióticos en la industria de la acuicultura para la producción de peces y gambas en granjas podría plantear problemas de salud y seguridad alimentaria, que no se abordan con la intensidad precisa en la mayoría de los países en vías de desarrollo. De hecho, la presencia de medicamentos veterinarios no autorizados (entre los que se incluyen los nitrofuranos) en importaciones de pescado y gambas procedentes de estos países ha sido documentada (13-15).

2.2. FRUTAS PROCESADAS Y PLAGUICIDAS

La fruta es reconocida por ser una fuente alimentaria rica en vitaminas, minerales, fibra y otros nutrientes. Se considera que su consumo como parte de la dieta habitual aporta un amplio rango de beneficios fisiológicos (como antioxidantes, antialérgicos, anticarcinogénicos, antiinflamatorios, etc.) ⁽¹⁶⁾, contribuyendo a un estilo de vida saludable y a la prevención de enfermedades. En este contexto, la continua demanda mundial de fruta procesada (confituras, jaleas, mermeladas, purés, zumos, fruta en almíbar, etc.) ha facilitado que la tecnología de procesado y de conservación haya ganado importancia gradualmente a lo largo de los años. Actualmente, la producción y el procesado de fruta están entre las principales industrias en muchos países, convirtiéndose su comercio y distribución en una importante actividad económica a nivel internacional ⁽¹⁶⁾. Es un hecho conocido que la fruta es un producto de temporada delicado y perecedero, que únicamente está disponible fresco unas semanas o meses al año. Por tanto, el principal objetivo de procesar fruta es poder disponer de esta materia prima de forma saludable y segura a lo largo de todo el año, incluyendo fruta fuera de temporada ⁽¹⁷⁾. Es preciso señalar que el procesado de productos alimenticios generalmente implica la aplicación de una serie de métodos y técnicas para llevar a cabo la transformación de un producto crudo perecedero en un producto de valor añadido, que posee una mayor vida útil y por tanto, una mayor disponibilidad para su consumo ⁽¹⁸⁾. Este procesado puede implicar varias etapas tales como clasificación, lavado, enfriamiento, congelación, tratamiento térmico (calentamiento, cocción), concentración, pelado, escaldado, reducción de tamaño, deshidratación o enlatado ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

De acuerdo con la FAO, la producción total de fruta en el mundo se incrementó desde 470,4 millones de toneladas durante 1999-2000 a 587,6 millones de toneladas en 2009 ⁽¹⁶⁾. En esta intensificación de su producción agrícola juegan un papel fundamental las innovaciones técnicas en la protección de cultivos. Dichas innovaciones incluyen la posible aplicación de una amplia variedad de plaguicidas regulados durante la cosecha y/o durante su almacenamiento post-cosecha, que aportan mejoras en el rendimiento de la producción, asegurando la calidad del producto final y satisfaciendo las necesidades de los consumidores y del comercio nacional e internacional ^(20,21). Significar que aunque en los últimos tiempos la agricultura ecológica es una tendencia en auge y crecimiento, al contrario de lo que la mayoría de los consumidores piensa, “ecológico” no siempre necesariamente implica “libre de plaguicidas” u otros productos químicos ⁽²¹⁾.

Es un hecho conocido que los residuos de los plaguicidas aplicados pueden persistir en frutas, incluso cuando éstas son sometidas a posteriores técnicas de procesado. Y pese a que en los años recientes la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ⁽²²⁾, basándose en estudios llevados a cabo ⁽¹⁸⁾, ha argumentado que la presencia de residuos en alimentos sin procesar tiende a ser mayor que en productos procesados, residuos de diversos plaguicidas han sido detectados en purés de fresa y otras frutas procesadas ⁽²³⁻²⁶⁾. En este sentido, es importante tener en consideración que los niveles de plaguicidas encontrados en frutas procesadas dependen de factores adicionales a la mera producción agrícola, tales como el tipo de materia activa y sus propiedades físico-químicas, el producto frutícola, el tratamiento aplicado y los procesos de degradación del plaguicida presentes en la matriz agrícola ^(24,27).

3. CONTROL AMBIENTAL: AGUA Y SEDIMENTOS

El actual desarrollo industrial ha contribuido al uso y producción de un extenso rango de sustancias químicas, productos de degradación y subproductos (28,29), como es el caso particular de los contaminantes orgánicos persistentes, conocidos internacionalmente por su acrónimo en inglés, POPs (*Persistent Organic Pollutants*). Como desarrollaremos en el sub-apartado **4.2.1** de esta Memoria, los POPs son un heterogéneo grupo de compuestos tóxicos que han sido producidos por el hombre e introducidos en el medio ambiente en grandes cantidades desde la década de 1950 (29-31). En particular, muchas de estas sustancias a menudo alcanzan el ecosistema marino, que desafortunadamente representa a nivel mundial el depósito final de gran cantidad de residuos humanos e industriales (28). La contaminación de los lagos, vías fluviales, ríos y eventualmente los mares, por sustancias químicas tóxicas puede producirse por el depósito de estos compuestos procedentes de la atmósfera (presentes en ésta como consecuencia de la quema de desechos) y por la descarga incontrolada de contaminantes industriales y efluentes de aguas residuales contaminadas (29). Como consecuencia, la contaminación química de las aguas continentales y marinas representa un problema global de irrefutable importancia (32-34).

De acuerdo con el Real Decreto 1620/2007 (35), la reutilización de las aguas residuales está permitida si cumplen con unos criterios de calidad mínima de acuerdo a su uso. Estas aguas tratadas pueden ser usadas en agricultura, para fines industriales y municipales, para usos medioambientales, como recarga de acuíferos, o pueden verterse tras su tratamiento en los ríos o en el mar (32). Sin embargo, a veces los tratamientos aplicados en las plantas de depuración de aguas residuales

no son lo suficientemente exhaustivos como para eliminar completamente los compuestos orgánicos. Por tanto, los efluentes de las aguas urbanas pueden convertirse en una fuente de contaminantes diferentes, algunos de ellos tóxicos para el medio ambiente ⁽³²⁾.

Dentro de la amplia variedad de contaminantes orgánicos potencialmente presentes en agua, los PAHs son de particular importancia, debido a su extensa distribución, persistencia y toxicidad ⁽³³⁾. Estos compuestos fueron considerados como POPs de producción no intencional según el Reglamento (Comunidad Europea, CE) N° 850/2004 ⁽³⁶⁾ e incluidos dentro del listado de sustancias tóxicas sujetas a disposiciones de reducción de emisiones (aunque no estén incluidos en el listado del Convenio de Estocolmo) ⁽³⁷⁾, (véase apartado 5 de normativa vigente). Por tanto, en el marco de esta Tesis nos referiremos a los POPs incluyendo a los PAHs, conforme al Reglamento (CE) N° 850/2004 ⁽³⁶⁾.

Los POPs tienden a acumularse en la fracción orgánica de los sedimentos del ecosistema acuático, adsorbiéndose en las partículas y depositándose fácilmente ^(28,29) debido a su baja solubilidad en agua y a su alta naturaleza hidrofóbica. Por esta razón, los sedimentos son considerados el principal reservorio de estos contaminantes en los sistemas acuáticos, dónde pueden permanecer extensos períodos de tiempo hasta ser eliminados completamente del ciclo del agua ^(38,39). Estos sedimentos actúan como fuente de contaminación local o incluso global de compuestos orgánicos a nivel de trazas, originándose su liberación de forma lenta pero continua, y pudiéndose acumular en los seres vivos acuáticos como consecuencia de su exposición crónica ^(28,34,38,40). De hecho, el consumo de productos del mar se considera una de las principales fuentes de contaminantes organoclorados para los

seres humanos en todo el mundo (29,34,40). Por esta razón, el análisis de la biota (pescado, marisco y crustáceos) y de los sedimentos se ha empleado a lo largo de los años para evaluar y controlar exhaustiva y eficazmente la exposición del medio ambiente acuático a estos compuestos tóxicos (31).

4. ANALITOS

4.1. SEGURIDAD ALIMENTARIA

4.1.1. Nitrofuranos

Los nitrofuranos (**Figura 1.2**), clasificados como un subgrupo específico dentro de los agentes coccidiostáticos (5,41) (**Figura 1.3**), son agentes quimioterapéuticos sintéticos de amplio espectro antimicrobiano, activos frente a bacterias *gram*-positivas (tales como *Staphylococcus* o *Streptococcus*), bacterias *gram*-negativas (por ejemplo *Escherichia Coli* o *Salmonella*) y algunos protozoos (como es el caso de *Giardia* o *Histomonas meleagridis*) (13,42). Es preciso señalar que las propiedades antibacterianas de los nitrofuranos vienen determinadas por el grupo nitro característico (-NO₂) que poseen enlazado al carbono 5 (C5) del anillo furano (**Figura 1.2**) (43).

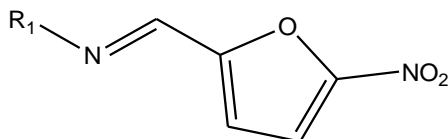


Figura 1.2. Estructura general de los nitrofuranos

Dentro de la familia de los nitrofuranos destacan por su mayor importancia furazolidona (FZD), furaltadona (FTD), nitrofurazona (NFZ) y nitrofurantoína (NFT). Estos compuestos han sido ampliamente utilizados durante al menos cinco décadas para el control bacteriano y de protozoos, prevención y tratamiento de infecciones

gastrointestinales y respiratorias y como aditivos en piensos ejerciendo de promotores del crecimiento (44), debido a su bajo coste, su genérica disponibilidad y su gran eficacia contra infecciones resistentes (42). Además, han contado con la ventaja de no contribuir al desarrollo de resistencia antimicrobiana (45). Los nitrofuranos se aplicaron con tales fines principalmente en ganado (aves de corral, cerdo y vacas), acuicultura (pescado y gamba) y en colonias de abejas, hasta su prohibición en la Unión Europea (UE) entre los años 1993 (46) y 1995 (FZD) (47) debido a su toxicidad. De hecho, se ha observado actividad mutagénica en levaduras, hongos, bacterias, ratas y ratones, y se han comportado como citotóxicos en células de mamíferos en cultivo (*in vitro*) (48-52).

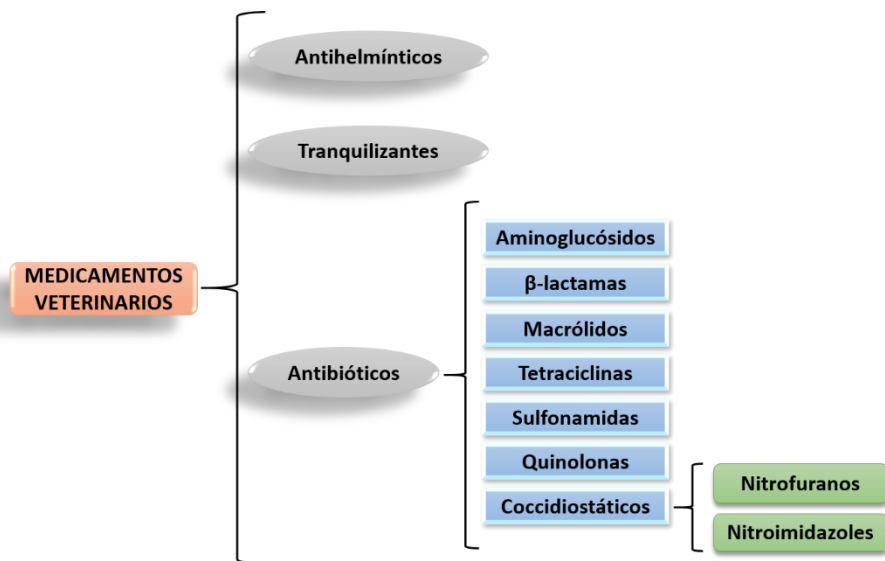


Figura 1.3. *Clasificación general de los medicamentos veterinarios (41).*

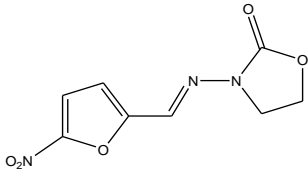
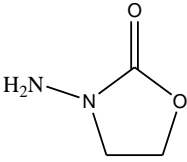
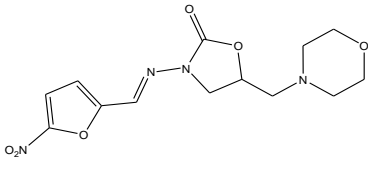
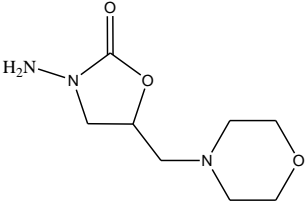
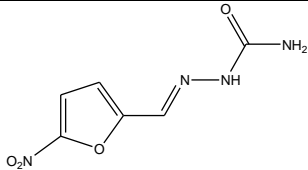
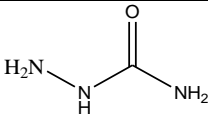
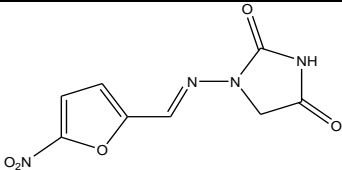
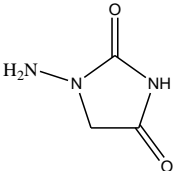
No obstante, los nitrofuranos son todavía comúnmente utilizados como medicamentos veterinarios en algunos países en desarrollo debido a sus características ya mencionadas de bajo coste y efectividad (13,53). Por ello, resulta de interés contribuir al desarrollo de métodos sensibles y fiables

para detectar los residuos de estos compuestos en productos del mar conforme a los requerimientos legales de la UE.

Los nitrofuranos son profármacos, es decir, medicamentos que son administrados en una forma biológicamente inactiva pero que son convertidos en una activa a través de un proceso metabólico natural ⁽⁵⁴⁾. FZD, FTD, NFZ y NFT se metabolizan rápidamente transformándose en sus derivados: 3-amino-2-oxazolidinona (AOZ), 3-amino-5-morfolinometil-1,3-oxazolidinona (AMOZ), semicarbazida (SEM) y 1-aminohidantoin (AHD), respectivamente (**Tabla 1.1**) ⁽⁵⁴⁾. Estos metabolitos se enlazan fuertemente a las proteínas y son altamente persistentes en los tejidos animales. A pesar de que el metabolismo de estos agentes antimicrobianos no está bien documentado, es importante tener presente que sus derivados aún conservan ciertas cadenas procedentes de los compuestos de partida, lo cual puede provocar que mantengan su toxicidad en el caso de que sean liberados de sus enlaces con proteínas bajo las condiciones de acidez normal en el estómago humano ⁽⁴¹⁾. Debido a su rápido metabolismo, los nitrofuranos presentan una vida media corta, lo que determina su rápida eliminación en sangre y tejidos y hace que su concentración descienda rápidamente por debajo de los límites de detección (LODs) y de cuantificación (LOQs) de los métodos analíticos. Sin embargo, debido a que después del tratamiento, los metabolitos formados (AOZ, AMOZ, AHD y SEM) permanecen estables, enlazados a proteínas en el organismo durante muchas semanas e incluso meses, el análisis de estos compuestos suele estar basado en la determinación de sus metabolitos ⁽⁵⁵⁾.

Es importante, por tanto, puntualizar que cuando en la presente Tesis se hable del análisis de nitrofuranos nos estaremos refiriendo a los metabolitos formados en el organismo.

Tabla 1.1. Estructuras de los nitrofuranos y sus metabolitos.

NITROFURANO ORIGINAL	METABOLITO
 <p data-bbox="305 562 543 591">Furazolidona (FZD)</p>	 <p data-bbox="694 552 1071 581">3-amino-2-oxazolidinona (AOZ)</p>
 <p data-bbox="312 836 536 865">Furaltadona (FTD)</p>	 <p data-bbox="701 836 1067 894">3- amino-5-morfolinometil-1,3-oxazolidinona (AMOZ)</p>
 <p data-bbox="299 1087 550 1116">Nitrofurazona (NFZ)</p>	 <p data-bbox="755 1083 1009 1112">Semicarbazida (SEM)</p>
 <p data-bbox="292 1325 557 1354">Nitrofurantoína (NFT)</p>	 <p data-bbox="735 1331 1030 1360">1-aminohidantoin (AHD)</p>

4.1.2. Plaguicidas

El término “plaguicida” engloba a toda sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o controlar cualquier plaga, incluidas especies de plantas o animales no deseadas durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y procesamiento de alimentos, productos agrícolas o piensos para animales que se les pueda

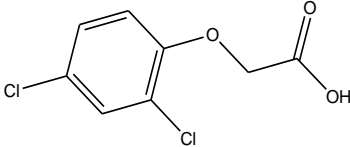
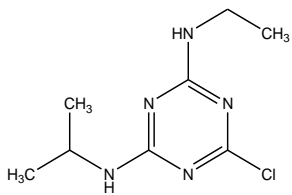
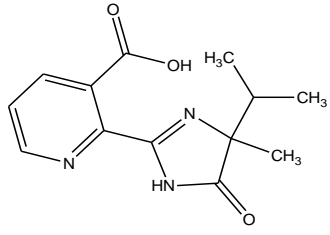
administrar para el control de ectoparásitos ⁽¹⁾. Están incluidas también aquellas sustancias destinadas a ser aplicadas como regulador de crecimiento de plantas, defoliante, desecante, agente adelgazante de la fruta o inhibidor de la germinación y sustancias utilizadas en los cultivos antes o después de la cosecha a fin de proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte ⁽¹⁾. El uso más habitual de los plaguicidas es en forma de productos fitosanitarios, que son “formulados” que contienen al menos una sustancia activa, es decir, cualquier producto químico, extracto de planta, feromona o microorganismo (incluidos los virus) que actúe contra las plagas, las plantas, partes de plantas y productos vegetales ⁽⁵⁶⁾. A fin de regular su utilización, estos compuestos químicos deben someterse, entre otros, a ensayos de eficacia e impacto ambiental y toxicológico para ser registrados por los gobiernos para su uso legal en aplicaciones específicas ^(56,57). Adicionalmente, se han implantado las normas de Buenas Prácticas Agrícolas (GAP), que incluyen el uso seguro de los plaguicidas autorizados a nivel nacional en condiciones reales necesarias para un control de plagas efectivo y fiable ⁽¹⁾. En la actualidad se ha alcanzado un progreso notable en el desarrollo de plaguicidas efectivos, lo que no obvia que la mayoría de ellos se encuentran ocasionalmente como residuos en el medio ambiente y en las cadenas alimenticias terrestres y acuáticas, dónde tienden a concentrarse ⁽¹⁸⁾. A pesar de que durante los últimos años se están usando plaguicidas semipolares, e incluso polares (considerablemente menos persistentes y con menor tendencia a la bioacumulación en la biota), que están reemplazando a los clásicos organoclorados, los nuevos compuestos siguen entrañando un riesgo potencial para el ser humano y el medio ambiente ^(58,59).

Los plaguicidas comprenden un amplio rango de sustancias con diversas propiedades físico-químicas que pueden clasificarse atendiendo a varias de sus características principales, como son la toxicidad aguda, la vida media, su naturaleza, estructura química y su uso ⁽⁶⁰⁾. En 1978 la Organización Mundial de la Salud (OMS) los clasificó en: extremadamente, altamente, moderadamente o ligeramente peligrosos, en función de su peligrosidad o grado de toxicidad aguda. Esta toxicidad aguda se define como la capacidad del plaguicida de provocar un daño agudo a la salud a través de una o varias exposiciones, en un período de tiempo relativamente reducido. Su magnitud puede medirse mediante ciertos índices como la dosis letal media (DL_{50}) y la concentración letal media (CL_{50}) ⁽⁶⁰⁾. Atendiendo a su vida media, los plaguicidas pueden clasificarse como permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes. Y según su función específica, se pueden distinguir, entre otros: herbicidas, fungicidas, insecticidas, acaricidas, nematocidas, molusquicidas, rodenticidas, reguladores del crecimiento, repelentes y biocidas ^(56,60,61). Adicionalmente, de una forma más genérica y tradicional, este amplio grupo de compuestos puede diferenciarse en orgánicos e inorgánicos, siendo la mayoría de los plaguicidas utilizados actualmente de naturaleza orgánica. A su vez, los orgánicos pueden ser naturales o sintéticos ⁽⁶²⁾.

Finalmente, en la **Tabla 1.2** mostrada a continuación puede observarse una clasificación de algunos de los tipos de plaguicidas según su estructura química ^(60,62).

Tabla 1.2. *Clasificación de los plaguicidas.*

FUNCIÓN ESPECÍFICA	FAMILIA QUÍMICA	CARACTERÍSTICAS GENERALES	EJEMPLOS	EJEMPLOS DE MOLÉCULAS
Insecticidas y acaricidas	<i>Organoclorados</i>	- Hidrocarburos clorados sintéticos - Alta estabilidad físico-química, hidrofóbicos y liposolubles - Elevada toxicidad y alta persistencia	DDT Endosulfán	 DDT
	<i>Organofosforados</i>	- Se descomponen y degradan fácilmente - Originan productos solubles en agua y menos persistentes	Clorpirifos Dimetoato	 DIMETOATO
	<i>Carbamatos</i>	- Relativamente inestables, corto tiempo de persistencia ambiental - Metabolitos hidrosolubles	Metomilo Pirimicarb	
	<i>Piretroides</i>	- Piretrinas sintéticas - Poca tendencia a acumularse en tejidos y fácilmente degradables	Cipermetrina Deltametrina	 DELTAMETRINA
	<i>Bioplaguicidas</i>	- Relativamente no tóxicos para el ser humano y el medio ambiente - Derivados de materiales naturales como animales, plantas, bacterias y ciertos minerales	Rotenona Espinosad Piretrinas I y II	
Herbicidas	<i>Carbamatos</i>	- Derivan del ácido carbámico - Inhibidores meristemáticos	Clorprofám Desmedifam	
	<i>Herbicidas fenoxi (o fenoxiacéticos)</i>	- Actúan selectivamente como reguladores del crecimiento de las plantas (herbicidas hormonales)	2,4-D Diclorprop	

FUNCIÓN ESPECÍFICA	FAMILIA QUÍMICA	CARACTERÍSTICAS GENERALES	EJEMPLOS	EJEMPLOS DE MOLÉCULAS
Herbicidas		- Relativamente volátiles		 <p style="text-align: center;">2,4-D</p>
	<i>Bipiridilos</i>	- Control de malas hierbas, no selectivos - Solubles en agua	Diquat Paraquat	
	<i>Tiocarbamatos</i>	- Inhiben el crecimiento meristemático de las plantas - Su actividad se da a través del suelo	EPTC Triallato	
	<i>Ureas y uracilos</i>	-Inhiben la fotosíntesis de las plantas -Control de malas hierbas	Diurón Linurón Lenacilo	 <p style="text-align: center;">ATRAZINA</p>
	<i>Triazinas</i>	-Inhiben la capacidad de fotosíntesis de las plantas -Gran tendencia a la lixiviación	Atrazina Simazina	
	<i>Herbicidas benzoicos</i>	- Reguladores del crecimiento de las plantas (herbicidas hormonales)	Dicamba Cloramben	 <p style="text-align: center;">IMAZAPIR</p>
	<i>Acetanilidas</i>	- Control de muchas gramíneas anuales y malezas - Actividad a través del suelo	Acetocloro Metalocloro	
	<i>Sulfonilureas</i>	- Grupo de reciente aparición, elevada actividad a dosis bajas - Inhibidores meristemáticos	Clorsulfurón Metsulfurón-metilo	
	<i>Imidazolinonas</i>	- Amplio espectro de aplicación - Inhiben la biosíntesis dentro de la planta de crecimiento activo (Inhibidores meristemáticos)	Imazapir Imzetapir	

Abreviaturas. DDT: Dicloro difenil tricloroetano.

4.2. CONTROL AMBIENTAL

4.2.1. Contaminantes Orgánicos Persistentes

Los POPs constituyen un extenso y variado grupo de sustancias químicas orgánicas, en su mayoría organocloradas, que han sido masivamente empleadas en diversas aplicaciones de naturaleza industrial y agrícola ⁽⁶³⁾. Particularmente, su uso procede de mediados del pasado siglo, coincidiendo con el auge de un desarrollo industrial que implicó la comercialización de decenas de miles de sustancias sintéticas. A partir de entonces se ha constatado que los POPs representan una amenaza global a tener en cuenta para la salud humana y el medio ambiente, debido a las características intrínsecas que poseen:

- Son resistentes a la degradación fotolítica, biológica y química, por lo que pueden mantener su naturaleza y persistir en el medio ambiente durante largos períodos de tiempo ^(63,64). Como se ha mencionado anteriormente, debido a su baja solubilidad en agua y elevada naturaleza hidrofóbica, los POPs tienden a participar en procesos de “sorción” en las partículas de los ecosistemas acuáticos y a acumularse en los sedimentos del fondo, que pueden llegar a constituir importantes y longevos depósitos de estos compuestos ^(39,65).
- Son bioacumulables debido a su naturaleza orgánica lipofílica. Por ello, se bioacumulan fácilmente en tejidos grasos de los seres vivos y se biomagnifican, es decir, tienden a incrementar notoriamente su concentración a medida que se asciende a niveles más altos de la cadena trófica ^(63,65) (**Figura 1.4**). De hecho, las concentraciones pueden aumentar hasta 70 mil veces el nivel inicial ⁽⁶⁴⁾. Peces, aves depredadoras, mamíferos y humanos están en el nivel superior de la cadena alimentaria y son, por tanto, los que están expuestos a las

mayores concentraciones. Así, pueden permanecer en el interior de los organismos vivos sin descomponerse o metabolizarse durante décadas, pudiendo transmitirse a la descendencia (63).

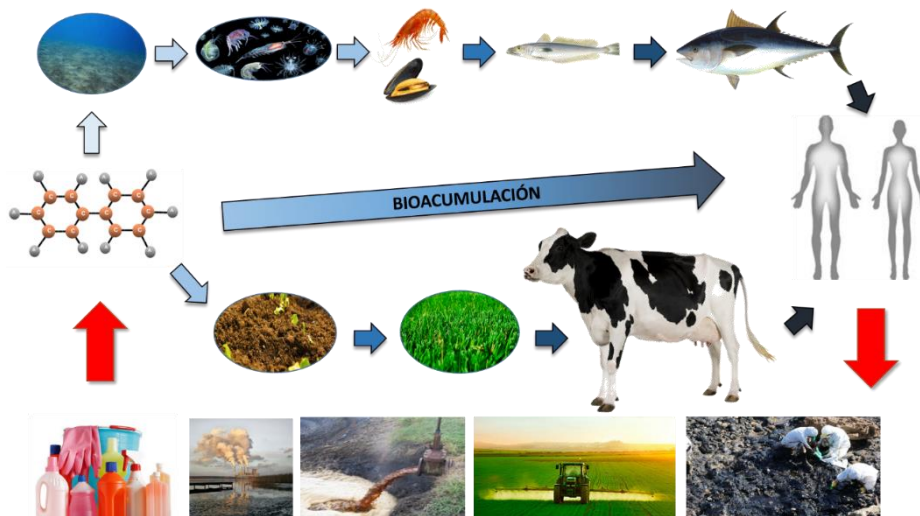


Figura 1.4. Esquema genérico que refleja el origen, la distribución en el medio ambiente y la introducción y biomagnificación de los POPs en la cadena alimentaria.

- Presentan una elevada toxicidad para el ser humano, los seres vivos y el medio ambiente (29,30,66-67). Efectos específicos de los POPs pueden incluir cáncer, alergias e hipersensibilidad, daño a los sistemas nerviosos centrales y periféricos, trastornos reproductivos y alteración del sistema inmune (64). Algunos de estos compuestos son también considerados disruptores endocrinos, los cuales, alterando el sistema hormonal pueden dañar el sistema inmune y reproductor de los individuos expuestos, al igual que los de sus descendientes.
- Pueden transportarse a larga distancia en el medio ambiente como consecuencia de los procesos naturales que involucran suelo, agua y aire. Al ser semivolátiles, pueden adoptar la forma de vapor o

presentarse adsorbidos sobre partículas atmosféricas y propagarse fácilmente ⁽⁶³⁾. Así, pueden llegar a detectarse en lugares en los que nunca han sido producidos o utilizados ⁽⁶⁴⁾.

A pesar de que existen algunas fuentes naturales de POPs, como son los incendios forestales o las erupciones volcánicas, en su mayor parte proceden de actividades humanas asociadas a la industria química y los procesos industriales. Asimismo, pueden provenir de emisiones en procesos de combustión, quema de basura o incluso calefacción doméstica.

Es preciso señalar que, aunque inicialmente solo doce POPs fueron incluidos en el Convenio de Estocolmo firmado en 2001 ⁽⁶⁴⁾, a lo largo de los años se han ido añadiendo otras sustancias tanto en dicho Convenio como en el Reglamento (CE) N° 850/2004 ⁽³⁶⁾ (**Tabla 1.3**).

Atendiendo a su origen, estos contaminantes ambientales pueden clasificarse en tres grandes grupos:

1. **Plaguicidas:** de uso fitosanitario y/o biocida. Agentes químicos fitosanitarios utilizados desde mediados del siglo XX a fin de mejorar el rendimiento de las cosechas y productos biocidas aplicados en la lucha contra los vectores patógenos (organismos que actúan como transmisores de agentes infecciosos) y enfermedades, como la malaria ^(29, 30). Pese a su eficacia, a partir de los años 70 se comenzó a limitar la aplicación de estos compuestos con características POPs debido a que resultaron altamente perjudiciales para el ser humano y los ecosistemas agrícolas, encontrándose actualmente prohibido su uso en la UE.

2. **Sustancias de uso industrial** (químicos industriales). Cada producto que se fabrica puede contener una o más sustancias químicas, por ejemplo medicamentos, detergentes, pinturas o plásticos. Aunque la mayoría de los POPs están prohibidos en el ámbito industrial,

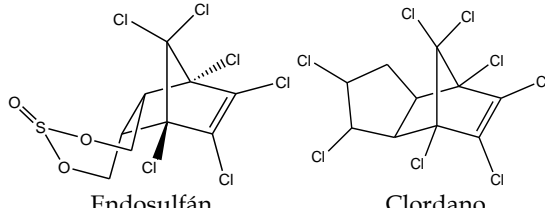
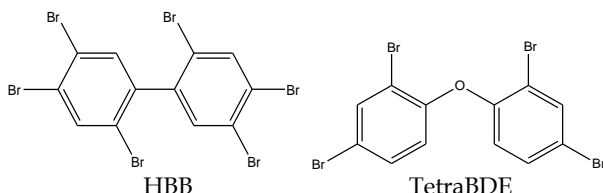
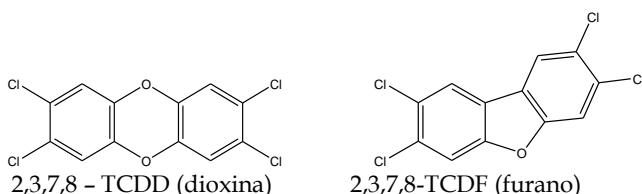
estuvieron en uso hasta hace relativamente poco tiempo, por lo que todavía pueden encontrarse en algunos productos y residuos ⁽⁶³⁾.

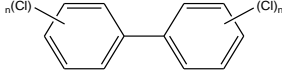
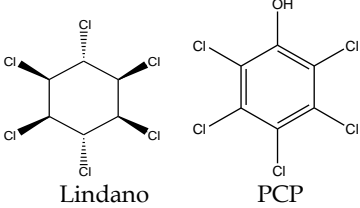
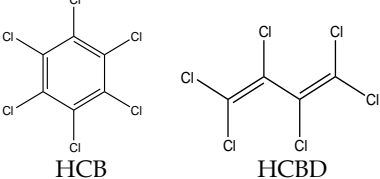
3. Subproductos: sustancias que se originan y emiten de forma no intencionada en procesos térmicos con presencia de materia orgánica y cloro. No existe intención de producción ni de uso comercial y a menudo proceden de fuentes difusas. Incineración de residuos sólidos urbanos y hospitalarios, la producción de energía a través de combustibles como carbón, madera, aceites combustibles para motores y gas, lodos de depuradora, lixiviados de vertederos, el tráfico, calefacciones/cocinas domésticas e incendios forestales o crematorios, son algunas de las múltiples fuentes no intencionadas de POPs ⁽⁶³⁾.

No obstante, es preciso matizar que hay sustancias que pueden incluirse dentro de más de un grupo dado que se han empleado con distintos objetivos. Este es el caso de los bifenilos policlorados (PCBs), que aparte de su uso industrial, también han sido emitidos no intencionalmente en procesos de combustión e industriales. Análogamente, el hexaclorobenceno (HCB), que en el pasado fue usado como biocida, producto fitosanitario y en aplicaciones industriales, también ha sido liberado como subproducto en determinados procesos ⁽⁶³⁾.

La **Tabla 1.3** muestra un resumen de los principales POPs y de su clasificación. Aunque no aparecen enumeradas en la tabla, actualmente varias sustancias han sido propuestas y/o se encuentran en evaluación por su toxicidad para ser consideradas como POPs (no incluidas en **Tabla 1.3**) ⁽⁶⁴⁾: dicofol y metoxicloro (plaguicidas); ácido pentadecafluorooctanoico (PFOA) y sus sales (uso industrial y subproducto no intencionado); o el ácido perfluorohexano-1-sulfónico (PFHxS) (uso industrial).

Tabla 1.3. Clasificación general de los POPs según su origen y aplicación.

ORIGEN Y USO	POPs		EJEMPLOS DE ESTRUCTURAS MOLECULARES
Plaguicidas	Aldrina ^{1,2}	Heptacloro ^{1,2}	 <p>Endosulfán Clordano</p>
	Clordano ^{1,2}	Endosulfán ⁴	
	Dicloro difenil tricloretano (DDT) ^{1,2}	Mirex ^{1,2}	
	Dieldrina ^{1,2}	Toxafeno ^{1,2}	
	Endrina ^{1,2}	Clordecona ^{2,3}	
Industrial	Hexabromobifenilo (HBB) ^{2,3}		 <p>HBB TetraBDE</p>
	Difeniléteres bromados (PBDEs) ³		
	Hexabromociclododecano (HBCD) ⁵		
	Ácido perfluorooctano sulfónico (PFOS), sus sales y fluoruro de perfluorooctano sulfonilo ³		
	Cloroalcanos de cadena corta (PCCC C ₁₀ -C ₁₃) ^{2,7}		
Subproductos no intencionados	PCDD/Fs: Dibenzo- <i>p</i> -dioxinas policloradas (dioxinas) + dibenzofuranos policlorados (furanos) ^{1,2}		 <p>2,3,7,8 - TCDD (dioxina) 2,3,7,8-TCDF (furano)</p>
	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) ²		
Industrial /	Bifenilos policlorados (PCB) ^{1,2}		

ORIGEN Y USO	POPs	EJEMPLOS DE ESTRUCTURAS MOLECULARES
Subproducto no intencionado	Naftalenos policlorados (PCN) ^{2,6}	 PCBs
Industrial/ Plaguicida	Hexaclorociclohexanos (α y β -HCH - incluido Lindano, γ HCH) ^{2,3}	 Lindano PCP
	Pentaclorofenol (PCP) ⁶	
Industrial/ Plaguicida/ Subproducto no intencionado	Hexaclorobenceno (HCB) ^{1,2}	 HCB HCBd
	Hexaclorobutadieno (HCBd) ^{2,6}	
	Pentaclorobenceno (PeCB) ³	

¹Doce POPs iniciales (“*Docena Sucia*”) en 2001 (Convenio de Estocolmo); ²Compuestos clasificados como POPs por el Reglamento (CE) N° 850/2004; ³POPs incluidos en 2009 (C. Estocolmo); ⁴POP incluido en 2011 (C. Estocolmo); ⁵Incluido en 2013 (C. Estocolmo); ⁶Incluidos en 2015 (C. Estocolmo); ⁷Incluidos en 2017 (C. Estocolmo).

En términos generales, aunque con ciertas excepciones, la producción y el uso de los POPs y sus productos en España están prohibidos. No obstante, pese al amplio abanico de medidas aplicadas, y al hecho de que la producción de la mayoría de los POPs cesó hace casi 20 años, niveles considerables de estos contaminantes todavía permanecen en el medio ambiente ⁽³⁰⁾. Por tanto, existe una ineludible necesidad de desarrollar métodos para la monitorización de estos contaminantes en los sistemas acuáticos con el objetivo de evaluar el riesgo para los seres vivos y la salud humana.

4.2.2. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

Los PAHs constituyen un amplio grupo de compuestos orgánicos (más de 100 sustancias) que se caracterizan por presentar una estructura compuesta de átomos de carbono e hidrógeno formando dos o más anillos aromáticos fusionados sin ningún heteroátomo o sustituyente ^(68,69) (algunos ejemplos de PAHs estudiados en esta Tesis se muestran en la **Figura 1.5**).

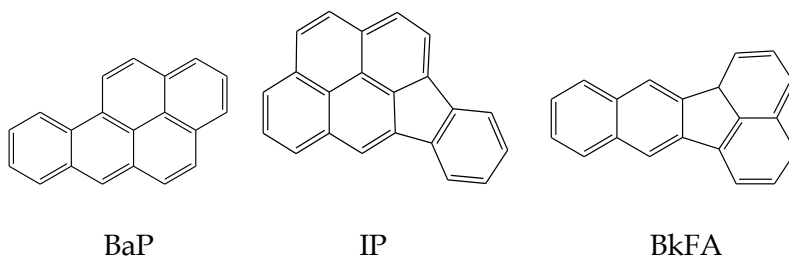


Figura 1.5. Estructuras de algunos ejemplos de PAHs: benzo[*a*]pireno (BaP), indeno[1,2,3-*cd*]pireno (IP) y benzo[*k*]fluoranteno (BkFA).

Aquellos compuestos constituidos por cinco o más anillos aromáticos se conocen como PAHs “pesados”, mientras que los que contienen menos de cinco, se conciben como “ligeros”. Aunque ambos tipos de compuestos son apolares, dotados de una alta naturaleza lipofílica, los

PAHs pesados presentan una mayor estabilidad y toxicidad que sus análogos ligeros ^(68,70).

Los PAHs exhiben todas las propiedades normalmente atribuidas a los POPs (de hecho, la UE los incluyó en el Reglamento N° 850/2004 ⁽³⁶⁾ sobre POPs como sustancias sujetas a restricciones, aunque no aparezcan en el Convenio de Estocolmo). Así, son contaminantes medioambientales ubicuos que están muy extendidos a nivel mundial y que son producidos por una amplia variedad de procesos de pirolisis y combustión de fuentes naturales y antropogénicas (aproximadamente el 90% de las emisiones) ^(33,69-71). Estos contaminantes pueden además ingresar en el medio acuático desde fuentes industriales, deposición atmosférica, derrames de petróleo y escorrentía urbana ⁽³³⁾, y los humanos pueden estar expuestos a ellos a través del agua potable ⁽⁷⁰⁾.

Adicionalmente, varios PAHs han sido considerados carcinógenos genotóxicos y se les han atribuido efectos biológicos y mutagénicos ^(66,68) y otros que no han sido definidos como carcinógenos, pueden actuar como sinergistas ⁽⁷⁰⁾. El hecho, no obstante, de que la exposición de los humanos a estas sustancias suceda siempre en forma de mezclas complejas de PAHs (no se encuentran de forma individual) y de que, por tanto, no se trate de una composición constante, dificulta la evaluación de las consecuencias para la salud ⁽⁷⁰⁾.

Los miembros de este grupo de contaminantes tóxicos que han sido más extensivamente monitorizados son los que están incluidos en la lista de contaminantes orgánicos prioritarios de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) en los Estados Unidos (US-EPA) y se conocen como los “16 EPA PAHs” ⁽⁷²⁾. Asimismo, la UE presenta otra lista de sustancias prioritarias en el ámbito medioambiental de la política de

aguas, entre las que se incluyen varios PAHs ⁽⁷³⁾ (véase sub-apartado 5.2 de normativa vigente en control ambiental).

5. NORMATIVA VIGENTE

5.1. SEGURIDAD ALIMENTARIA

Para proteger a los consumidores de los riesgos que implica sobre la salud la presencia de contaminantes en los alimentos, organizaciones internacionales y nacionales han establecido regulaciones a fin de asegurar la seguridad alimentaria. La UE ha liderado propuestas en cuanto a promover regulaciones basadas en estudios científicos de evaluación de riesgos y garantizar un suministro seguro de alimentos ^(6,74). En este sentido, la UE fundó la EFSA, encargada de suministrar asesoramiento científico independiente sobre riesgos relacionados con los alimentos, para proteger a los consumidores, los animales y el medio ambiente ⁽⁷⁵⁾. La EFSA es la responsable del Informe Anual de Residuos de Plaguicidas, que reúne y analiza la información aportada por los programas de monitorización realizados por los Estados Miembros. Adicionalmente, el Sistema de Alerta Rápida para alimentos y piensos (RASFF) ⁽⁷⁶⁾ intercambia información sobre las medidas tomadas en respuesta a los riesgos graves detectados en lo que a dichos alimentos y piensos se refiere.

En este contexto, el Reglamento (Comunidad Económica Europea, CEE) N° 315/93 ⁽⁷⁷⁾ pretende proteger la salud pública estableciendo procedimiento comunitarios para prohibir la puesta en el mercado de productos alimenticios que contienen proporciones inaceptables de sustancias residuales que define como “contaminantes”. Asimismo, el Reglamento (CE) N° 178/2002 ⁽⁷⁴⁾ implantó los principios, requisitos y procedimientos generales de la legislación y seguridad alimentaria. Adicionalmente, la UE ha establecido límites máximos de residuos

(LMRs) para muchos plaguicidas ⁽⁷⁸⁾ y medicamentos veterinarios ⁽⁷⁹⁾ en una amplia variedad de productos alimenticios. Genéricamente, el LMR es la cantidad máxima de residuos permitidos legalmente en los alimentos ⁽⁸⁰⁾. En los casos de ausencia de LMR establecido para algunas combinaciones alimento-plaguicida, se aplica el nivel de 0,01 mg/kg, mientras que para medicamentos veterinarios se impone una estricta política de “tolerancia cero”.

A nivel nacional, la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) ⁽⁸¹⁾, fundada en 2014, es la encargada de controlar el mercado alimentario español mediante evaluación de los riesgos que afecten a la seguridad alimentaria, asegurando el cumplimiento de la legislación y ofreciendo garantías e información a los consumidores.

En el ámbito internacional, la Administración de los Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos (US) es la responsable de la seguridad alimentaria y los límites (también conocidos como tolerancias) están publicados en el Código de Regulaciones Federales (CFR). La FDA es la encargada de publicar un resumen anual que agrupa los resultados de programas de monitorización de contaminantes, mientras que la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) se dedica al desarrollo de métodos oficiales de análisis para un amplio espectro de compuestos y matrices, entre los que se incluyen los plaguicidas y los medicamentos veterinarios. También a nivel internacional, el Codex Alimentarius ⁽⁸²⁾, que es un organismo creado por la OMS y la FAO, tiene como principal objetivo proteger la salud de los consumidores, garantizar prácticas comerciales justas en el intercambio de alimentos y promover la coordinación de todos los trabajos relacionados con normas alimentarias emprendidos

por organizaciones internacionales y no gubernamentales. Entre sus actuaciones, ha establecido el indicador de “ingesta diaria aceptable” (ADI) y LMRs a nivel mundial para medicamentos veterinarios y plaguicidas, considerados indicativos pero no reglamentarios ⁽⁸³⁾. Estos niveles pueden, no obstante, aplicarse como guía en caso de no existir ninguna otra legislación vigente sobre la materia en cuestión y se consideran estándares comerciales para garantizar que los alimentos importados y exportados sean seguros para el consumo. Si bien muchos países se refieren al Codex para los LMR, lograr una armonización global es todavía un proceso continuo que está pendiente de completarse con éxito ⁽⁸⁰⁾.

En cualquier caso, el control tanto del cumplimiento de LMRs de plaguicidas como de la ausencia de residuos de nitrofuranos en alimentos se realiza a través de laboratorios acreditados en la Norma ISO 17025. A tal fin, dichos laboratorios deben disponer de métodos de análisis validados para cada posible tándem analito-matriz, que cumplan con los requisitos analíticos establecidos en normas y guías internacionales.

En la **Tabla 1.4** se presenta un resumen de la legislación y las regulaciones básicas sobre plaguicidas y medicamentos veterinarios, incluyendo guías que proporcionan criterios relativos a la validación de métodos analíticos.

5.1.1. Nitrofuranos

Genéricamente, el Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo de 26 de junio de 1990 ⁽⁸⁴⁾ define «residuos de medicamentos veterinarios» como *todas las sustancias farmacológicamente activas, ya sean principios activos, excipientes o productos de degradación, y sus metabolitos que permanezcan en los productos alimenticios obtenidos a partir de animales a los que se les hubiere*

administrado el medicamento veterinario de que se trate. Asimismo, este Reglamento define «LMR» como el contenido máximo de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario (expresado en mg/kg o en µg/kg sobre la base del peso en fresco) autorizada en la Comunidad o reconocida como admisible en un producto alimenticio. Dicho límite se basará en el tipo y en la cantidad de residuos que se considere que no constituyen ningún riesgo toxicológico para la salud humana tal como expresa la dosis diaria admisible (DDA), o sobre la base de un DDA temporal que utilice un factor de seguridad adicional. Para establecer su valor se tomará en consideración, asimismo, otros riesgos relativos a la salud pública así como los aspectos de tecnología alimentaria (84).

La Directiva 96/23/CE del Consejo de 29 de abril de 1996 (94) regula el control de residuos de sustancias farmacológicamente activas, por ejemplo, medicamentos veterinarios, contaminantes ambientales, colorantes, elementos químicos, etc., en productos de origen animal. Asimismo, esta Directiva divide todos los residuos en dos grupos; el Grupo A incluye sustancias con efecto anabolizante y las sustancias no autorizadas del Anexo IV del Reglamento (CEE) N° 2377/90 (84) y el Grupo B, comprende todos los medicamentos veterinarios registrados conforme los Anexos I y III (84) y otros contaminantes (**Tabla 1.5**).

Por su parte, el Reglamento (CE) N° 470/2009 (79), que deroga el Reglamento (CEE) n° 2377/90 (84), establece los procedimientos para fijar los LMRs de las sustancias farmacológicamente activas que pueden ser permitidas en alimentos de origen animal. Posteriormente, la lista actualizada de sustancias con LMR y de aquéllas prohibidas por la UE fue incluida en el Reglamento (UE) N° 37/2010 (86).

Tabla 1.4. Resumen de la legislación vigente aplicable a plaguicidas y medicamentos veterinarios en alimentos dentro del marco europeo e internacional.

		PLAGUICIDAS	MEDICAMENTOS VETERINARIOS
UE	<i>Legislación (LMRs)</i>	<p>-Reglamento (CE) N° 396/2005 ⁽⁸⁵⁾: Relativo a los LMRs de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal</p> <p>-UE- Base de datos plaguicidas ⁽⁷⁸⁾: Alrededor de 1100 plaguicidas registrados y valor por defecto de 0,01 mg/kg para las sustancias que no aparecen registradas</p>	<p>-Reglamento (CE) N° 470/2009 ⁽⁷⁹⁾: Establece procedimientos comunitarios para establecer LMRs</p> <p>-Reglamento (UE) N° 37/2010 ⁽⁸⁶⁾:</p> <ul style="list-style-type: none"> Incluye lista de sustancias permitidas (Anexo I), no permitidas (Anexo II) y LMRs (Anexo III); 225 medicamentos veterinarios y MRPLs especificados para sustancias no autorizadas Nitrofuranos (incluida furazolidona): sustancias prohibidas. No puede establecerse LMR
	<i>Guías</i>	<p>-Validación y procedimientos de control de calidad (SANTE/12682/2019) ⁽⁸⁷⁾</p>	<p>-Criterios y procedimientos para validar los métodos analíticos y MRPL (Decisión de la Comisión 2002/657/CE ⁽⁸⁸⁾ y Decisión de la Comisión 2003/181/CE ⁽⁸⁹⁾)</p> <p>MRPL= 1µg/kg para metabolitos de nitrofuranos en carnes de aves de corral y productos de la acuicultura (2003/181/CE)</p>
	<i>Otros Reglamentos y Directivas</i>	<p>Relativas a comercialización de productos fitosanitarios:</p> <p>-Reglamento (CE) N° 1107/2009 ⁽⁹⁰⁾, Reglamento de Ejecución N° 844/212 ⁽⁹¹⁾, Reglamento N° 283/213 ⁽⁹²⁾ y Reglamento N° 284/2013 ⁽⁹³⁾</p>	<p>-Directiva 96/23/CE ⁽⁹⁴⁾: Relativa a las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en animales vivos y sus productos</p> <p>-Directiva 2001/82/CE ⁽⁹⁵⁾: Establece código comunitario sobre medicamentos veterinarios</p> <p>-Reglamento (CE) N° 726/2004 ⁽⁹⁶⁾: Establece procedimientos para autorización y control de</p>

		PLAGUICIDAS	MEDICAMENTOS VETERINARIOS
			medicamentos en uso humano y veterinario, y crea la Agencia Europea de Medicamentos
US	<i>Legislación</i>	Código electrónico de Regulaciones Federales (eCFR) ⁽⁹⁷⁾ : 270 plaguicidas aprobados	FDA. CFR -Código de las Regulaciones Federales Título 21 ⁽⁹⁸⁾ : 94 tolerancias específicas para nuevos medicamentos veterinarios
	<i>Guías</i>	Métodos oficiales de AOAC Internacional ⁽⁹⁹⁾	Métodos Oficiales de AOAC Internacional ⁽⁹⁹⁾
<i>Otros Organismos Internacionales</i>		<ul style="list-style-type: none"> - Comité del Codex sobre Residuos de Plaguicidas (CCDR): establece más de 4300 LMR que afectan a unos 200 plaguicidas ⁽⁸²⁾ - Reunión Conjunta FAO/OMS sobre Residuos de Plaguicidas (JMPR): evaluación de riesgos 	<ul style="list-style-type: none"> - Comité del Codex sobre Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos (CCRVDF): establece LMR - Nitrofuranos: para furazolidona no puede establecerse LMR; tolerancia cero - Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA): Evaluación de riesgos

Abreviaturas. AOAC: Asociación de Químicos Analíticos Oficiales; CE: Comunidad Europea; FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación; FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos; LMR: límite máximo de residuos; MRPL: Límite de funcionamiento mínimo exigido; OMS: Organización Mundial de la Salud; UE: Unión Europea; US: Estados Unidos.

Tabla 1.5. Anexo I de la Directiva 96/23/CE del Consejo (94). Clasificación de los residuos

GRUPO A. Sustancias con efecto anabolizante y sustancias no autorizadas	GRUPO B. Medicamentos veterinarios y contaminantes
<ol style="list-style-type: none"> 1. Estilbenos, derivados de los estilbenos, sus sales y ésteres 2. Agentes antitiroidianos 3. Esteroides 4. Lactonas ácidas resorcílicas (incluido Zeranol) 5. β-agonistas 6. Sustancias incluidas en el Anexo IV del Reglamento (CEE) n° 2377/90 del Consejo: <ol style="list-style-type: none"> 6.1. <i>Aristolochia spp.</i> Y sus formulaciones 6.2. <i>Cloramfenicol</i> 6.3. <i>Cloroformo</i> 6.4. <i>Clorpromacina</i> 6.5. <i>Colchicina</i> 6.6. <i>Dapsona</i> 6.7. <i>Dimetridazol</i> 6.8. <i>Metronidazol</i> 6.9. Nitrofuranos (incluida furazolidona) 6.10. <i>Ronidazol</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sustancias antibacterianas, incluidas sulfamidas, quinolonas 2. Otros medicamentos veterinarios <ol style="list-style-type: none"> 2.1. <i>Antihelmínticos</i> 2.2. <i>Anticoccidianos, incluidos los nitroimidazoles</i> 2.3. <i>Carbamatos y piretroides</i> 2.4. <i>Tranquilizantes</i> 2.5. <i>Antiinflamatorios no esteroideos (AINS)</i> 2.6. <i>Otras sustancias que ejerzan una actividad farmacológica</i> 3. Otras sustancias y contaminantes medioambientales <ol style="list-style-type: none"> 3.1. <i>Compuestos organoclorados, incluidos los PCB</i> 3.2. <i>Compuestos organofosforados</i> 3.3. <i>Elementos químicos</i> 3.4. <i>Micotoxinas</i> 3.5. <i>Colorantes</i> 3.6. <i>Otros</i>

Abreviaturas. CEE: Comunidad Económica Europea; PCB: bifenilos policlorados.

En lo referente específicamente a los nitrofuranos y sus metabolitos, como consecuencia de las dudas existentes acerca de la seguridad de estos medicamentos veterinarios para la salud humana, la UE prohibió en 1993 el uso de FTD, NFT y NFZ en animales destinados a la producción alimentaria, actualizándose el anexo IV del Reglamento (CEE) n° 2377/90 (84) para incluirlos mediante el Reglamento (CEE) N°

2901/93⁽⁴⁶⁾. En el caso de la FZD se estableció un LMR provisional de 5 µg/kg en todas las especies animales destinadas a consumo humano⁽⁴⁶⁾. Sin embargo, puesto que la seguridad de este compuesto y su metabolito tampoco podía garantizarse, finalmente fue también incluido en el Anexo IV⁽⁴⁷⁾ (**Tabla 1.5**). Por tanto, a partir de enero de 1997, los nitrofuranos dejaron de estar permitidos como medicamentos veterinarios en la UE. En el Reglamento (UE) N° 37/2010⁽⁸⁶⁾, estos compuestos (incluida la FZD) están clasificados como sustancias prohibidas para las cuales no puede establecerse LMR, y para las que existe una “*tolerancia cero*”. Aparecen además incluidos dentro del anteriormente mencionado Grupo A de sustancias con efecto anabolizante y sustancias no autorizadas del Anexo I de la Directiva 96/23/CE⁽⁹⁴⁾ (véase **Tabla 1.5**).

En cuanto a la normativa relacionada con el control de estos compuestos, la Directiva 96/23/CE⁽⁹⁴⁾ establece planes nacionales de vigilancia para el control de sus residuos en laboratorios acreditados a fin de establecer su presencia y concentración en animales destinados a consumo humano⁽¹⁰⁰⁾. Dichos planes de control se realizan en una red oficial de laboratorios organizados jerárquicamente, que incluye, en el nivel más bajo, los llamados Laboratorios de Rutina y/o Campo (RFLs), seguidos por los Laboratorios de Referencia Nacional (NRLs) y, en la parte superior, los Laboratorios de Referencia Comunitarios (CRLs)⁽⁵⁾. La correcta implementación de estos programas de monitoreo y vigilancia de residuos implica disponer de métodos analíticos trazables en dichos laboratorios.

Las directrices técnicas y los criterios de funcionamiento relativos a los métodos analíticos y la interpretación de los resultados para el control de residuos en el marco de la Directiva 96/23/CE se abordan en la

Decisión de la Comisión 2002/657/CE ⁽⁸⁸⁾. Este es, por tanto, el documento legislativo guía que debe ser consultado por los laboratorios de control de residuos. En el mismo se introduce, además, para los compuestos clasificados como Grupo A ⁽⁹⁴⁾, el concepto de «Límite mínimo de funcionamiento exigido (MRPL)» como *el contenido mínimo de un analito en una muestra que debe ser detectado y confirmado*. Este concepto sirve para armonizar el funcionamiento analítico de los métodos aplicables a las sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido ⁽⁸⁸⁾. Como resultado de la detección de la presencia de sustancias para las que se atribuye la conocida como “tolerancia cero” en alimentos de origen animal, a través de la Decisión de la comisión 2003/181/CE ⁽⁸⁹⁾, se fijaron valores de MRPL armonizados en consulta con los CRLs, los NRLs y los Estados miembros. En el caso concreto de los nitrofuranos, en el Anexo II de la Decisión de la comisión 2003/181/CE ⁽⁸⁹⁾ se estableció un MRPL de 1 µg/kg para sus metabolitos en carne de aves de corral y productos de la acuicultura. Este nuevo límite representa el requerimiento mínimo para el nivel de detección de un método, y debe ser tenido en consideración a la hora de desarrollar y validar métodos para análisis de estas sustancias prohibidas.

El límite de decisión ($CC\alpha$) y la capacidad de detección ($CC\beta$) reemplazan los anteriormente usados LOD y LOQ ^(12,88). « $CC\alpha$ » se considera el límite en el cual y a partir del cual se debe concluir con una probabilidad de error α (5%) que una muestra no es conforme (positiva). Es decir, α refleja la probabilidad de falsos positivos. « $CC\beta$ » es el contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de error β (1% para sustancias prohibidas y 5% para sustancias del Grupo B). Por tanto, β

refleja el índice de probabilidad de falsos negativos (12,88). La Decisión 2002/657/EC introduce también el criterio para el análisis confirmatorio basado en los conocidos como puntos de identificación (IPs) (88). Así, para el caso concreto de los nitrofuranos, que forman parte de los analitos objeto de estudio en esta Tesis, al estar incluidos en el Grupo A como sustancias prohibidas, son necesarios un mínimo de cuatro IPs para alcanzar una identificación y confirmación satisfactoria. Actualmente las técnicas de confirmación para medicamentos veterinarios se basan en cromatografía de líquidos (LC) acoplada a diferentes analizadores de espectrometría de masas (MS), como se verá en detalle en el apartado 7.1.

En lo que a la legislación de US se refiere, la FDA establece tolerancias para los medicamentos veterinarios bajo la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (FFDCA), estando dichos límites publicados en el CFR (97). En dicho CFR, la FDA también prohíbe el uso de nitrofuranos en animales destinados a la producción de alimentos (101). Adicionalmente, en el Codex aparece descrito que para la FZD no existe un nivel seguro de residuos o de sus metabolitos en los alimentos que represente un riesgo aceptable para los consumidores (Tabla 1.4). Los nitrofuranos están también regulados a nivel internacional a un nivel objetivo de 1 µg/kg en US y Canadá.

5.1.2. Plaguicidas

El marco legislativo en materia de residuos de plaguicidas se encuentra establecido en el Reglamento (CE) N° 396/2005 (85), en cuyos Anexos II y III se listan los LMRs fijados por la CE (78,85) para proteger a los consumidores de la exposición a niveles inaceptables de dichos residuos en alimentos. Sin embargo, en este Reglamento se establecen límites únicamente sobre materias primas sin transformar, por lo que para

conocer el LMR de productos transformados es necesario aplicar factores de transformación (concentración, dilución, etc.) sobre el LMR del producto inicial ⁽¹⁰²⁾. No obstante, estos factores está previsto que se recojan en el anexo VI del Reglamento 396/2005 (aún no publicado) ⁽¹⁰²⁾. Por lo tanto, actualmente, el papel de establecer el factor a aplicar dependiendo del procesamiento al que se ha sometido el producto crudo recae en el operador. No obstante, organismos como el Instituto para la Evaluación del Riesgo de Alemania (BfR, desde 2007) ⁽²⁷⁾ y la EFSA (desde 2018) ⁽¹⁰³⁾, ofrecen bases de datos que recopilan factores de procesado de referencia ⁽¹⁰²⁾.

Por su parte, el Reglamento (CE) N° 1107/2009 ⁽⁹⁰⁾ es el encargado de regular la comercialización de productos fitosanitarios en la UE para reafirmar las prácticas agrícolas adecuadas. Relacionados con dicha comercialización cabe mencionar también los Reglamentos N° 844/2012 ⁽⁹¹⁾, 283/213 ⁽⁹²⁾ y 284/2013 ⁽⁹³⁾ (**Tabla 1.4**).

Por otro lado, a nivel europeo la Guía SANTE/12682/2019 ⁽⁸⁷⁾ establece los criterios que deben satisfacer los métodos analíticos para control de residuos de plaguicidas en alimentos y pienso. El cumplimiento de dichos criterios es imprescindible para otorgar validez y fiabilidad a los resultados de los estudios de monitorización a fin de verificar el cumplimiento de los LMRs y evaluar la exposición del consumidor. Operando de esta forma, se garantiza la comparabilidad de los resultados analíticos entre diferentes laboratorios en la UE, con el objeto de evitar los falsos negativos y positivos, así como el funcionamiento armonizado del sistema.

A nivel internacional, la EPA de US regula los plaguicidas aplicados por los productores para proteger los cultivos ⁽¹⁰⁴⁾, mientras que la FDA es

la que se encarga de fijar las tolerancias de residuos estableciendo los LMRs que pueden estar legalmente presentes en los alimentos.

Por otra parte, la FAO y la OMS elaboran especificaciones de plaguicidas con el fin de establecer normas de calidad para su uso y proteger a consumidores y medio ambiente, además de fomentar la aplicación del Código Internacional de Conducta para el manejo de plaguicidas ⁽⁸²⁾ (**Tabla 1.4**).

5.2. CONTROL AMBIENTAL

A fin de eliminar o, en su caso, minimizar al máximo la presencia de los POPs en el medio ambiente, se ha establecido un marco normativo mundial, europeo y nacional, que se complementan entre sí, estableciendo los principios sobre los que trabajar, las medidas de control y gestión y las metas a conseguir en la lucha contra estos contaminantes ubicuos. En particular, debido a la importancia de la calidad del agua, y a la necesidad irrefutable de adoptar medidas para revertir las tendencias negativas y proteger este inestimable recurso natural, se ha implantado una estricta legislación relacionada con ésta que afecta a los POPs, entre otros contaminantes (**Tabla 1.6**).

En el ámbito internacional, mencionar que en 1972 se fundó el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente, PNUMA (UNEP, por sus siglas en inglés *United Nations Environment Programme*), como principal autoridad mundial en el contexto ambiental, y desde entonces, se han ido ejecutando diversos programas internacionales con el objetivo de combatir los efectos dañinos de las sustancias químicas ⁽⁶³⁾. Fue en el año 2004 (aunque se firmó en 2001), cuando entró en vigor el conocido Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes del PNUMA ⁽³⁷⁾, constituyendo el principal acuerdo internacional fijado con el propósito de controlar estas sustancias y así proteger la salud

humana y el medio ambiente. Para ello estableció varias medidas con el objeto de eliminar, y/o restringir en determinados casos, las liberaciones al medio ambiente y prohibir la producción, exportación, importación y el uso de los POPs de producción intencional, así como reducir progresivamente las emisiones no intencionadas. El Convenio de Estocolmo aplicó asimismo medidas para fomentar el tránsito a sustancias químicas más seguras, e incluir nuevos POPs en el listado original. Adicionalmente, este Convenio considera imprescindible la identificación de stocks que contienen estos tóxicos a fin de gestionarlos eficazmente, así como de los emplazamientos contaminados, para poder emprender procesos de recuperación ambiental ⁽⁶³⁾. Y estableció también un Plan de Monitorización Global de POPs que incluye el desarrollo de métodos analíticos y programas de monitorización de estos contaminantes en alimentos, humanos y medio ambiente ⁽¹⁰⁵⁾.

También en el ámbito internacional, la US-EPA ha propuesto una lista de contaminantes orgánicos prioritarios debido a su elevada toxicidad ⁽¹⁰⁸⁾, además de establecer límites de tolerancia en agua subterránea y potable para PAHs (100-300 ng/L) y otros POPs ⁽¹⁰⁹⁾.

A nivel europeo se estableció la Directiva Marco del Agua de la UE (WFD, del inglés *Water Framework Directive*, Directiva 2000/60/CE) ⁽¹⁰⁶⁾, que compromete a los estados miembros europeos a alcanzar un estado ecológico y químico adecuado de todas las aguas. Establece un marco de protección para todas las aguas superficiales interiores, aguas de transición, costeras y subterráneas, a fin de prevenir el deterioro y promover su uso sostenible, tanto a medio como largo plazo ^(34,106). En este contexto, la Decisión 2455/2001/CE ⁽¹⁰⁷⁾ publicó por primera vez una lista de 33 compuestos prioritarios que representaban un riesgo

significativo para alcanzar dicho estado ecológico y que debían ser controlados en agua a fin de evaluar sus niveles.

Tabla 1.6. Resumen de la principal legislación vigente en vigor que afecta a los POPs y en particular, a los PAHs en agua.

LEGISLACIÓN VIGENTE	
INTERNACIONAL	<p>US-EPA: Establece una lista de contaminantes prioritarios y tolerancias en aguas subterráneas y de consumo ^(108,109)</p>
UE	<p>Directiva 98/83/CE: Límites máximos específicos de contaminantes en aguas de consumo humano</p> <p>Directiva (UE) 2015/1787 (modificando la Directiva 98/83/CE): especificaciones en programas de control y métodos de análisis en aguas de consumo</p> <p>Reglamento (CE) n° 850/2004, modificado por Reglamentos 756/2010, 757/2010 y 519/2012: Lista de sustancias peligrosas y medidas para proteger el medio ambiente y la salud humana</p> <p>Directiva 2009/90/CE (en conformidad con la Directiva 2000/60/CE): especificaciones técnicas del análisis químico y seguimiento del estado de las aguas</p> <p>Directiva 2013/39/UE (modifica las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE): Lista actualizada de sustancias prioritarias en aguas y normas de calidad ambiental (concentraciones máximas admisibles)</p>
NACIONAL	<p>Real Decreto 817/2015 (modificando el Real Decreto 60/2011): Normas de calidad ambiental para sustancias prioritarias y otros contaminantes en el ámbito de la política de aguas</p> <p>Real Decreto 902/2018 (modificando el Real Decreto 140/2003): criterios para la calidad de agua de consumo humano y especificaciones métodos de análisis</p>

Abreviaturas. CE: Comunidad Europea; UE: Unión Europea; US-EPA: Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos

Dicha lista revela que los contaminantes citados en ella, además de metales, pertenecen mayoritariamente a las siguientes familias de compuestos orgánicos: *i*) plaguicidas polares y apolares; *ii*) compuestos fenólicos; *iii*) PAHs, y *vi*) difeniléteres bromados (PBDEs). Se

establecieron Estándares de Calidad Ambiental (EQS) para controlar los niveles de concentración de estos compuestos en aguas superficiales (Directiva 2008/105/CE) ⁽¹¹⁰⁾ y especificaciones técnicas del análisis químico mediante la Directiva 2009/90/CE ⁽¹¹¹⁾. En base a esos EQS, los estados miembros tienen la obligación de establecer programas de monitorización para tener una visión global exhaustiva del estado de las masas de agua ⁽¹¹⁰⁾. La WFD establece que los métodos utilizados para el control analítico de sustancias deben presentar LOQs extremadamente bajos. Dicho valor de LOQ debe ser igual o inferior al 30% del promedio anual de los EQS (AA-EQS), que se encuentran en el rango de pg/L en algunos casos. La Directiva 2008/105/CE ⁽¹¹⁰⁾ presentó además una lista renovada de contaminantes prioritarios, incluyendo, junto con los citados anteriormente, otras sustancias como plaguicidas tipo ciclodieno (por ejemplo, aldrín). En estas Directivas se propone también una relación de otras posibles sustancias susceptibles de ser consideradas en el futuro como prioritarias ⁽¹¹⁰⁾. La Directiva 2013/39/UE ⁽⁷³⁾, que modifica la 2008/105/CE, incrementó el número de sustancias prioritarias a 45. Se incluyeron algunos POPs (como los PCBs o las dioxinas y furanos, conocidos conjuntamente como PCDD/Fs), y varios PAHs en particular, como sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas de la UE: naftaleno (NPH), antraceno (ANT), fluoranteno (FA), benzo[*a*]pireno (BaP), benzo[*b*]fluoranteno (BbFA), benzo[*ghi*]perileno (BghiP), benzo[*k*]fluoranteno (BkFA) e indeno[1,2,3-*cd*]pireno (IP). Esta Directiva también actualizó los EQS y estableció límites anuales promedio muy restrictivos para estos compuestos en aguas superficiales interiores y otras aguas superficiales ⁽⁷³⁾.

Asimismo, a fin de garantizar los criterios de calidad del agua para consumo humano y, por tanto, la seguridad del consumidor, se establecieron límites máximos específicos para algunos PAHs (y otros contaminantes) en este tipo de agua mediante la Directiva 98/83/CE ⁽¹¹²⁾: BaP (0,01 µg/L) y para la suma de BbFA, BkFA, BghiP e IP (0,10 µg/L). Posteriormente, la Directiva (UE) 2015/1787 ⁽¹¹³⁾ introdujo modificaciones con respecto a la Directiva 98/83/CE ⁽¹¹²⁾ en lo referente a los requisitos mínimos de los métodos de análisis y los programas de control de todas las aguas destinadas al consumo humano.

Por otro lado, el Reglamento (CE) N° 850/2004 ⁽³⁶⁾ sobre POPs previamente mencionado, fue aprobado como marco jurídico común a nivel europeo para ejecutar las disposiciones del Convenio de Estocolmo. Este Reglamento, entre otras medidas, prohibió la producción, comercialización y el uso de todas las sustancias producidas de forma intencional presentadas en el Convenio, a excepción de casos concretos de aplicaciones específicas. Posteriormente, los Reglamentos (UE) N° 756/2010 ⁽¹¹⁴⁾, 757/2010 ⁽¹¹⁵⁾, y 519/2012 ⁽¹¹⁶⁾ sobre POPs, modificando dicho Reglamento (CE) N° 850/2004 ⁽³⁶⁾, se unieron al establecimiento de medidas para reducir y eliminar sus emisiones a fin de minimizar su presencia en el medio ambiente.

Finalmente, a nivel nacional, la legislación española sobre sustancias peligrosas se adaptó a las obligaciones derivadas de las Directivas 2008/105/CE ⁽¹¹⁰⁾ y 2009/90/CE ⁽¹¹¹⁾ mediante el Real Decreto 60/2011 ⁽¹¹⁷⁾ sobre los EQS de la política de aguas. No obstante, tras la aprobación a nivel europeo de la Directiva 2013/39/UE ⁽⁷³⁾, este Real Decreto se vio obligado a adaptarse a las nuevas exigencias estableciéndose nuevos criterios de seguimiento y evaluación del estado

de las aguas superficiales por mediación del vigente Real Decreto 817/2015 ⁽¹¹⁸⁾. Análogamente, los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, reflejados en el Real Decreto 140/2003 ⁽¹¹⁹⁾ (conforme a la Directiva 98/83/CE ⁽¹¹²⁾), fueron modificados por el Real Decreto 902/2018 ⁽¹²⁰⁾. Esto se hizo con objeto de incorporar al derecho interno español lo dispuesto en la Directiva 2015/1787 de la UE ⁽¹¹³⁾, adoptando nuevos criterios básicos para el control de la calidad y los métodos de análisis utilizados.

6. TRATAMIENTO DE MUESTRA

Generalmente, el análisis de contaminantes a nivel de trazas en muestras alimentarias y ambientales implica tres etapas principales: *i)* pretratamiento de la muestra, que incluye procesos como reducción del tamaño de partícula, homogeneización, etc.; *ii)* la extracción de los analitos de la matriz, que implica la separación de dichos analitos del resto de componentes de la muestra, y que puede incluir también tanto la limpieza o *clean-up* (eliminación de los compuestos potencialmente interferentes de la muestra), como la pre-concentración de estos analitos de interés en un solo paso o varios (a fin de mejorar la selectividad y sensibilidad); y *iii)* la determinación instrumental de los compuestos.

La etapa de extracción juega un papel crucial en el proceso analítico, debido al elevado grado de manipulación al que la muestra se ve sometida previamente a la determinación instrumental. En términos generales, los métodos de extracción han consistido tradicionalmente en procedimientos tediosos y largos, que implicaban el consumo de grandes cantidades de muestra y de disolventes orgánicos, a veces tóxicos. No obstante, los métodos han ido evolucionando a lo largo de los años siendo reemplazados por otros más respetuosos con el medio ambiente (menor consumo de disolventes y de menor toxicidad), fáciles

de ejecutar, rápidos y eficientes y que presenten una elevada selectividad.

Una de las líneas de trabajo en los laboratorios de análisis de rutina se centra en desarrollar métodos genéricos capaces de cubrir una amplia gama de compuestos objetivo, a fin de brindar resultados multianálito fiables que satisfagan los requisitos del cliente al tiempo que se minimizan costes (6). No obstante, sigue siendo necesario el desarrollo de métodos específicos para algunos compuestos problemáticos, como es el caso, por ejemplo, de la familia de medicamentos veterinarios de los nitrofuranos.

6.1. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN EN MUESTRAS ALIMENTARIAS

La elevada complejidad que caracteriza a las muestras alimentarias (en ocasiones con alto contenido en grasas o azúcares) y las bajas concentraciones a las que se encuentran los analitos (en el rango de $\mu\text{g}/\text{kg}$, $\mu\text{g}/\text{L}$ o inferior), suponen un reto en el proceso de desarrollo de métodos rápidos y fiables, convirtiendo el tratamiento de la muestra en una etapa clave.

El resto de componentes de la matriz pueden afectar a la señal analítica de los analitos respecto a la obtenida en disolvente, ocasionando el denominado “efecto matriz”, capaz de disminuir o incrementar la ionización de los compuestos estudiados (80). Esto puede conducir, a su vez, a la obtención de una señal de intensidad inferior o superior y que afecte a la exactitud de los resultados analíticos. El efecto matriz constituye uno de los principales desafíos analíticos a los que hay que hacer frente en el tratamiento de la muestra para su posterior análisis utilizando técnicas cromatográficas acopladas a MS, por ejemplo, mediante la aplicación de etapas exhaustivas de limpieza.

6.1.1. Nitrofuranos en productos del mar

Tal como se ha mencionado anteriormente, debido a su rápido metabolismo, la mayoría de los métodos de análisis de estos compuestos se orientan hacia la determinación de sus metabolitos. Dado su bajo peso molecular y su elevada polaridad, estos metabolitos presentan una elución cromatográfica desfavorable en columnas de fase reversa (baja retención). Presentan además una baja eficiencia de ionización y un comportamiento de fragmentación no específico (predominantemente pérdida de amonio, agua o dióxido de carbono) ^(121,122). Poseen también una alta afinidad por enlazarse con los aminoácidos que se encuentran en el tejido muscular animal y forman enlaces covalentes metabolito-proteína muy estables. Por todo ello, es necesario que las muestras se sometan a métodos químicos para la liberación de los analitos, seguido de un proceso de derivatización a fin de resolver los problemas apuntados.

La liberación de los metabolitos de nitrofuranos puede realizarse mediante hidrólisis ácida de los enlaces formados entre estos compuestos y los aminoácidos ⁽¹²³⁾. Por su lado, la derivatización química se lleva normalmente a cabo mediante la reacción del recién liberado grupo amino del metabolito con el grupo aldehído del agente derivatizante 2-nitrobenzaldehído (2-NBA), mediante una adición nucleofílica, seguida por la eliminación de agua para formar la imina ⁽¹²³⁾ (**Figura 1.6**). Esta derivatización es también una etapa crucial para hacer posible su detección utilizando LC acoplada a MS en tándem (LC-MS/MS) ⁽¹²²⁾. Las masas moleculares totales de los compuestos se incrementan sustancialmente mediante la derivatización (iones padre están localizados en el rango de 209-335 Dalton), de modo que la señal se ve menos afectada por el ruido de fondo del MS. Por tanto, la

selectividad del método puede verse notablemente incrementada, dado que la hidrofobicidad del agente derivatizante contribuye a una mayor retención de los analitos en columnas de fase reversa. Ello permite una mejor separación de las moléculas de analito derivatizadas en matrices complejas ⁽⁵⁵⁾.

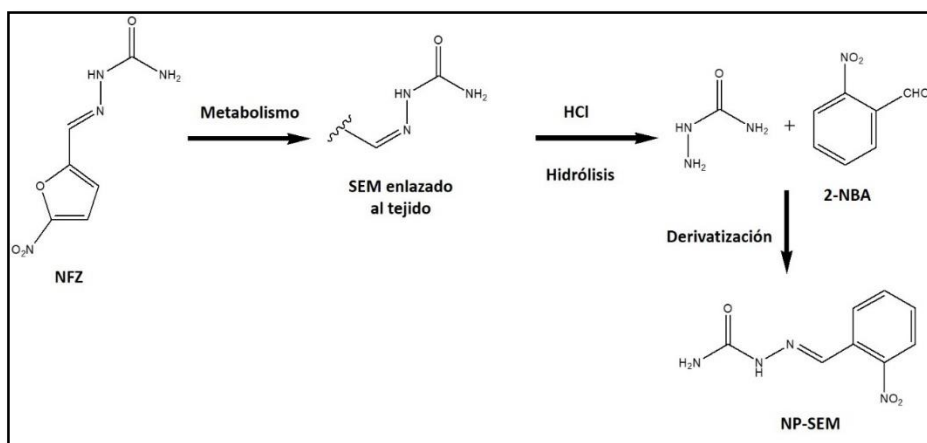


Figura 1.6. Esquema genérico de la hidrólisis ácida y de la derivatización con 2-nitrobenzaldehído (2-NBA) del metabolito semicarbazida (SEM) procedente de la nitrofurazona (NFZ).

La bibliografía disponible refleja que el procedimiento a seguir en el tratamiento de la muestra homogeneizada para la determinación de los metabolitos de nitrofuranos en productos del mar es largo y consta de varias etapas. La primera consiste en someter a los analitos en la muestra a una hidrólisis ácida suave (HCl diluido) y una derivatización (2-NBA) simultáneas ⁽¹²²⁻¹²⁶⁾ (**Tabla 1.7**). Esta primera etapa transcurre generalmente durante 16 h o toda la noche en un baño de agua (a 37°C) con agitación moderada ^(125,126) o en un horno ⁽¹²³⁾. Algunos autores inciden además en la necesidad de evitar la exposición de las muestras a la luz directa para prevenir cualquier posible fotodegradación ⁽¹²¹⁾.

Tabla 1.7. *Resumen bibliográfico del tratamiento de la muestra para análisis de los nitrofuranos en productos del mar.*

MATRIZ	TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	R (%)	REF.
Gamba	(1) Hidrólisis (HCl) + derivatización (2-NBA) (toda la noche, 37°C); (2) LLE (AcOEt) x2; (3) evaporación a sequedad; (4) Limpieza: LLE (hexano) x2	93-101%	(124)
Gambas	(1) Hidrólisis: Adición HCl + NTA; sonicación (5 min); (2) adición NaOAc + KCl y sonicación (1 min); (3) derivatización (37°C) toda la noche; (4) ajuste pH (NaOH + K ₂ HPO ₄); (5) LLE (AcOEt) x 2; (6) evaporación a sequedad (N ₂); (7) Limpieza: LLE (hexano)	>86%	(127)
Langostinos	(1) Hidrólisis: MeOH + HCl; centrifugación (25 min, 3000 rpm); (2) derivatización (2-NBA+ HCOOH 0,1%) asistida por microondas (6 min, 210 W); (3) ajuste pH (NaOH); (4) SPE (C18, elución AcOEt); evaporación a sequedad y reconstitución en fase móvil.	74-99%	(15)
Gambas	(1) Hidrólisis: HCl 0,5M + MeOH (3:7, v/v); agitación y ultrasonidos (40 min); (2) adición de KCl y sonicación (20 min); (3) centrifugación (20 min, 7200 rpm); (4) derivatización (HN) y evaporación hasta 1mL (N ₂ , 60°C); (5) adición K ₂ HPO ₄ ; (6) LLE (AcOEt) x2; (7) evaporación a sequedad y reconstitución (ACN/H ₂ O)	>87%	(53)
Bagres, cigalas y gambas	(1) Hidrólisis (HCl) + derivatización (2-NBA); agitación (20 s); 6 min en microondas (rampa de T hasta 95°C); (2) ajuste pH con K ₂ HPO ₄ (HCl o NaOH, si es preciso); (3) centrifugación (10 min, 3700 rpm); (4) filtración y centrifugación (5 min, 2500 rpm); (5) SPE automática (OASIS HLB, elución AcOEt); (6) evaporación y reconstitución en fase móvil; (7) agitación (10 s), sonicación (5 min) y filtración	89-107%	(54)
Gambas	(1) Hidrólisis (HCl) + derivatización (2-NBA) (16h, 37°C, agitación, baño de agua); (2) ajuste pH (K ₂ HPO ₄), agitación; (3) LLE (ACN), centrifugación (10 min, 3400 rpm); (4) adición NaCl, agitación y centrifugación (10 min, 3400 rpm); (5) evaporación a sequedad (N ₂) y reconstitución (fase móvil); (6) sonicación (2 min) y enfriamiento (30 min, 30°C); (7) centrifugación (10 min, 17000 rpm)	99-109%	(125)
Gambas	(1) Hidrólisis (HCl) + derivatización (2-NBA) (16h, 37°C, agitación, baño de agua); (2) ajuste pH (K ₂ HPO ₄ + NaOH); (3) centrifugación (5 min, 4000 rpm), lavado con H ₂ O y centrifugación (5 min, 4100 rpm); (4) limpieza:	93-120%	(126)

MATRIZ	TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	R (%)	REF.
	LLE (hexano) + SPE (OASIS HLB; elución AcOEt); (5) lavado con H ₂ O y agitación; (6) evaporación a sequedad (N ₂) y reconstitución (MeOH-H ₂ O)		
Pescado y marisco	(1) Hidrólisis (HCl) + derivatización (2-NBA), agitación (14h, 37°C); (2) ajuste pH (K ₂ HPO ₄ + NaOH + H ₂ O o HCl); (3) LLE (AcOEt); evaporación a sequedad y reconstitución en H ₂ O (en caso de matrices grasas, como salmón, LLE adicional con hexano); SPE (HLB); (4) evaporación a sequedad, reconstitución (H ₂ O) y centrifugación (10 min, 2000 rpm)	97-106%	(122)
Marisco y tilapia	(1) Hidrólisis (HCl) + derivatización (2-NBA) y agitación (10 min, 1100 rpm); horno, toda la noche (37°C); (2) ajuste pH (K ₂ HPO ₄ , NaOH o HCl), agitación y centrifugación (15 min, 4000 rpm); (3) adición de H ₂ O, agitación y centrifugación (5 min, 4000 rpm); (4) adición de NaCl; (5) LLE (AcOEt), agitación y centrifugación (5 min, 4000 rpm) x2; (6) evaporación a sequedad (N ₂) y reconstitución (NH ₄ OAc / MeOH); (7) sonicación y filtración	90-100%	(123)

Abreviaturas. ACN: acetonitrilo; AcOEt: Acetato de etilo; C18: octadecilsilica; HN: 2-hidroxi-1-naftaldehído; LLE: extracción líquido-líquido; MeOH: metanol; 2-NBA: 2-nitrobenzaldehído; NTA: 2-naftaldehído; R: recuperación; SPE: extracción en fase sólida; T: temperatura.

Después de la hidrólisis y derivatización, se procede a un ajuste del pH, añadiendo fosfato de hidrógeno dipotásico y con adición de HCl o NaOH, según el método (véase **Tabla 1.7**). Finalmente, es necesaria una etapa de extracción exhaustiva de los analitos (con un disolvente moderadamente polar) ^(53,123,125) y de limpieza para eliminar el exceso de reactivo derivatizante y eliminar lípidos, generalmente mediante extracción líquido-líquido (LLE) ^(124,126), aunque en una minoría de casos también se ha aplicado la extracción en fase sólida (SPE) reversa ⁽¹²²⁾ (**Figura 1.6** y **Tabla 1.7**). Sales como NaCl o KCl pueden añadirse para ayudar a eliminar proteínas y aumentar la solubilidad de los analitos en la fase orgánica, generando un efecto salino (*salting-out*) ^(53,123,125) (**Tabla 1.7**). En general, para pre-concentrar los analitos suele aplicarse una etapa final de evaporación a sequedad (generalmente con N₂) y redisolución en disolventes adecuados para su posterior análisis cromatográfico (**Tabla 1.7**).

Como se deduce de la bibliografía, tras la hidrólisis y derivatización (HCl + 2-NBA) simultánea durante toda la noche, diferentes combinaciones de métodos de extracción y limpieza se han aplicado para nitrofuranos en productos del mar (**Tabla 1.7**). Omitiendo la etapa de ajuste de pH previamente descrita, una extracción LLE doble con acetato de etilo seguida de limpieza mediante LLE con hexano (para eliminar las grasas remanentes) ha sido aplicada en el extracto derivatizado en muestras de gambas, obteniendo recuperaciones comprendidas entre 93-101% ⁽¹²⁴⁾. No obstante, es importante destacar que esta es la única referencia bibliográfica consultada que no describe la aplicación de una etapa de ajuste de pH tras la hidrólisis ácida y derivatización (**Tabla 1.7**). Análogamente, se ha aplicado una extracción con acetato de etilo en pescado y marisco ⁽¹²²⁾ pero con limpieza

mediante SPE (cartuchos HLB) y otra adicional del extracto mediante LLE con hexano en caso de matrices grasas (salmón), obteniéndose recuperaciones adecuadas (97-106%). También se ha descrito la extracción con acetonitrilo en muestras de gambas, en presencia de NaCl, con recuperaciones entre 99-109% ⁽¹²⁵⁾. La adición de sales (NaCl) es usual para otro tipo de muestras de pescado y marisco, tras añadir agua y aplicar una LLE posterior con acetato de etilo, logrando recuperaciones en el rango de 90-100% ⁽¹²³⁾. Buenas recuperaciones (93-120%) se obtienen en muestras de gambas ⁽¹²⁶⁾ aplicando una primera extracción con agua al extracto derivatizado (tras ajuste del pH), junto con una etapa de limpieza que combina LLE (hexano) y SPE (OASIS HLB) usando acetato de etilo como disolvente de elución, que tras ser re-extraído con agua, se lleva a sequedad redisolviendo finalmente en 400 μ L de metanol:agua.

Adicionalmente, para incrementar la eficiencia de extracción y disminuir el tiempo de derivatización, se ha utilizado un microondas durante la reacción ^(15,54). Así, la derivatización con 2-NBA asistida por microondas (6 min, 210 W) se ha aplicado en muestras de langostinos para el análisis de nitrofuranos, llevándose a cabo una extracción posterior mediante SPE con fase estacionaria de octadecilsilica (C18) y eluyendo los analitos con acetato de etilo (recuperaciones de 74-99%) ⁽¹⁵⁾. Análogamente, la derivatización con 2-NBA en microondas (6 min, aplicando rampa de temperatura hasta 95°C) se ha usado en muestras de gambas, bagres y cigalas seguida por una SPE (OASIS HLB, elución acetato de etilo) del extracto derivatizado, con recuperaciones entre 89-107% ⁽⁵⁴⁾.

Con el objetivo de tratar de reducir el tiempo de tratamiento de la muestra, algunos autores han propuesto agentes derivatizantes

diferentes, como 2-naftaldehído (NTA) ⁽¹²⁷⁾ o el uso del reactivo de derivatización fluorescente 2-hidroxi-1-naftaldehído (HN) ⁽⁵³⁾ en muestras de gambas, obteniéndose recuperaciones aceptables en los dos casos (>86% y >87%, respectivamente). En ambos estudios, también se lleva a cabo una LLE con acetato de etilo, y en el primero de ellos (derivatizante NTA), una limpieza adicional con hexano (LLE) ⁽¹²⁷⁾.

Sin embargo, pese a estos avances, la mayoría de los trabajos bibliográficos continúan aplicando la derivatización con 2-NBA.

6.1.2. Plaguicidas en frutas procesadas

Durante décadas la extracción de plaguicidas en alimentos se ha llevado a cabo mediante métodos tradicionales de preparación de muestra, basados en LLE en el caso de muestras líquidas y extracción sólido-líquido (SLE) en el caso de muestras sólidas ⁽¹²⁸⁾. Técnicas como SPE ^(23,24), microextracción en fase sólida (SPME) ⁽¹²⁹⁾, SPME espacio-cabeza (HS-SPME) ⁽⁵⁹⁾, microextracción en fase líquida (LPME), o incluso simple dilución e inyección directa ^(23,25), también han sido aplicadas para extracción de plaguicidas en zumos de frutas en particular. No obstante, algunas de estas técnicas se abordarán en mayor profundidad en el apartado **6.2.1** sobre muestras acuosas, mientras que en este apartado nos centraremos específicamente en los métodos de extracción para frutas procesadas tales como purés, confituras o mermeladas, por su mayor similitud con las matrices con las que se trabaja en la presente Tesis (**Tabla 1.8**). Hasta el momento, el número de estudios específicos sobre plaguicidas en purés y mermeladas de frutas es bastante reducido. Como puede observarse en la **Tabla 1.8**, se ha usado la extracción con disolventes para 24 plaguicidas en muestras de purés, néctares y zumos de frutas, utilizando acetona y una mezcla de acetato de etilo-ciclohexano con recuperaciones en el rango de 76-106% ⁽¹²⁸⁾.

Tabla 1.8. Resumen de procedimientos de tratamiento de muestra hallados en bibliografía para fruta procesada (purés y mermeladas).

Nº PLAGUICIDAS	MATRIZ	TRATAMIENTO DE MUESTRA	R (%)	REF.
24	Purés, néctares y zumos de frutas	(1) Ajuste pH (NaOH); (2) LLE (zumos) y SLE (néctares y purés): i) Acetona + NaCl; ii) AcOEt-ciclohexano; (3) Lavado: i).AcOEt-ciclohexano + Na ₂ SO ₄ anhidro; ii) AcOEt-ciclohexano; (4) evaporación sequedad (N ₂) y reconstitución (H ₂ O-ACN).	76-106%	(128)
14	Mermelada de fresa	(1) <u>QuEChERS</u> (Método EN 15662 de tampón citrato). Agitación (vortex), ultrasonidos y centrifuga (extracción); limpieza: <i>d</i> -SPE (MgSO ₄ , C18, PSA); (2) evaporación a sequedad (N ₂) y reconstitución (hexano).	89%	(134)
99	Mermelada de frutas	(1) <u>QuEChERS</u> (método tampón citrato); limpieza: <i>d</i> -SPE (MgSO ₄ , C18, PSA); (2) dilución extractos (ACN/H ₂ O).	70-120%	(26)
64	Mermelada de fruta	(1) " <u>QuEChERS original</u> "; limpieza: <i>d</i> -SPE (MgSO ₄ , C18, PSA); (2) dilución del extracto.	N.D.	(20)

Abreviaturas. ACN: acetonitrilo; AcOEt: acetato de etilo; C18: octadecilsilano; *d*-SPE: extracción en fase sólida dispersiva; LLE: extracción líquido-líquido; N.D.: no disponible; PSA: amina primaria/secundaria; R: recuperación; SLE: extracción sólido-líquido.

No obstante, para la extracción de plaguicidas en mermeladas y purés de fruta, el método predominante es el método de extracción en fase sólida dispersiva (*d*-SPE), conocido como “QuEChERS”, acrónimo en inglés de **Q**uick (rápido), **E**asy (fácil), **C**heap (barato), **E**ffective (efectivo), **R**ugged (robusto) y **S**afe (seguro) (130). Éste consiste en una SLE simplificada y miniaturizada, que fue inicialmente desarrollada en 2003 para el análisis de plaguicidas en vegetales con el objetivo de solventar las limitaciones que presentaban los métodos aplicados en este campo hasta la fecha (6, 61,131). El método QuEChERS ha ido además ganando popularidad a lo largo de los años debido a sus conocidas ventajas; la principal es su elevada eficacia y simplicidad en su aplicación al mayor desafío de los laboratorios de rutina en la actualidad: el desarrollo de métodos multirresiduo para la extracción de residuos de plaguicidas de distintas familias (con diversas propiedades físico-químicas) en un amplio rango de matrices (con características muy diversas) y a concentraciones iguales o inferiores a los LMRs. Requiere además de una pequeña fracción de muestra (10 g), utilizando un volumen reducido de disolvente orgánico (10 mL) (6,130). Es un método versátil que consta de dos etapas: una primera extracción simple con un disolvente orgánico en presencia de sales y una segunda etapa de limpieza mediante *d*-SPE (61,131). Así, el procedimiento QuEChERS original se basa en una extracción de los compuestos con acetonitrilo en muestras con alto contenido en agua (principalmente frutas y vegetales), seguida por una partición líquido-líquido de la fase orgánica mediante la adición de sales (cloruro sódico y sulfato de magnesio) (130,131). Después de la centrifugación, ambas fases son separadas y se procede a aplicar la etapa de *d*-SPE a una alícuota de fase orgánica, permitiendo la eliminación del agua presente y de

interferentes (lípidos, azúcares, ácidos orgánicos y pigmentos). Originalmente, se empleó amina primaria/secundaria (PSA) ^(130,131), pero otros materiales sorbentes tales como C18, carbón grafitizado negro (GCB) o sorbentes basados en dióxido de zirconio (por ejemplo, Z-Sep), han sido utilizados a fin de incrementar la eficiencia de la etapa de limpieza ^(6,61,80,132). La **Tabla 1.9** ofrece un resumen de las sales más habituales y su función específica.

Tabla 1.9. *Resumen de las principales sales utilizadas en el método QuEChERS.*

ETAPAS	SALES UTILIZADAS	FUNCIÓN ESPECÍFICA
Etapa 1. Extracción	<i>MgSO₄</i>	Retención de agua y mejora de la recuperación del analito al facilitar la partición de los plaguicidas en la fase orgánica (ACN)
	<i>NaCl</i>	Control de la polaridad favoreciendo la separación de fases (acuosa y orgánica)
	<i>Acetato de sodio</i>	Regulación del pH (compuestos sensibles a pH alcalinos)
	<i>Sales de citrato</i>	Ajuste del pH (5,5) para extraer componentes ácidos y básicos de la muestra
Etapa 2. Limpieza	<i>MgSO₄</i>	Eliminación del agua residual
	<i>PSA</i>	Eliminación de ácidos orgánicos, ácidos grasos, azúcares y pigmentos
	<i>C18</i>	Eliminación de grasas, esteroides y otros interferentes apolares
	<i>GCB</i>	Eliminación de pigmentos y esteroides
	<i>Z-Sep</i>	Eliminación de grasas (reducción efecto matriz)

Abreviaturas. ACN: acetonitrilo; C18: octadecilsilano; GCB: carbón grafitizado negro; PSA: amina primaria/secundaria; Z-Sep: sorbente basado en ZrO₂.

El procedimiento original ha sufrido diversas modificaciones, como el uso de acetonitrilo acidificado o la combinación de varios sorbentes durante la etapa de limpieza, a fin de mejorar la extracción de algunos

plaguicidas cuyas características intrínsecas dificultan su extracción (132,133).

En el caso particular de frutas procesadas como mermeladas y confituras, uno de los aspectos a tener presente es la complejidad de la matriz en cuanto a la presencia potencial de interferentes, ya que la preparación de estas conservas de frutas normalmente implica el uso de agentes gelificantes, así como azúcar o miel (134). Para estas matrices, en la etapa de *d*-SPE del QuEChERS se han usado como sorbentes sulfato de magnesio, C18 y PSA (20,26,134) (**Tabla 1.8**). Existen tres versiones oficiales del método:

- “Método original” QuEChERS (no tamponado; sulfato de magnesio y cloruro sódico) (131)
- Método Europeo UNE-EN 15662 (tampón citrato, pH 5-5,5; sulfato de magnesio, cloruro sódico, citrato tribásico de sodio dihidrato y citrato de sodio dibásico sesquihidrato) (135)
- Método AOAC 2007.01 (tampón acetato, pH 4,8; sulfato de magnesio y acetato sódico) (136)

Los procedimientos EN 15662 (135) y AOAC 2007.01 (136) son métodos tamponados que se emplean en la extracción de compuestos sensibles al pH para evitar su degradación, ya que permiten el control de éste durante esta etapa, mejorando la recuperación (80,130,137).

En la bibliografía sobre determinación de plaguicidas en fruta procesada, se ha aplicado tanto el método QuEChERS original (20) como el de tampón citrato (26,134) (**Tabla 1.8**), dependiendo del tipo de compuestos analizados en cada caso. Así, el QuEChERS original ha sido utilizado para el análisis de 64 plaguicidas representativos de distintas familias en varios tipos de matrices alimentarias, entre las que se incluyen mermeladas de frutas de alto contenido en azúcar y bajo

contenido en agua, obteniéndose buenos resultados (20). Análogamente, el método de tampón citrato se ha aplicado para la extracción de 14 plaguicidas organoclorados (OCPs) en mermelada de fresa (recuperación promedio de 89%) (134) y para 99 plaguicidas de distintas familias en muestras de mermelada de fresa, de uva, piña, melocotón y albaricoque (recuperación: 70-120%) (26).

Una de las debilidades del método QuEChERS es que no lleva a cabo una concentración de los compuestos de interés; por ello, generalmente es necesaria la evaporación del extracto (134) o la inyección de grandes volúmenes para la detección de los compuestos a niveles traza de concentración (6,133). Adicionalmente, una dilución del extracto final previa al análisis instrumental puede contribuir notoriamente a una disminución del efecto matriz (20,26,138). Sin embargo, esta dilución también puede provocar un incremento de los LOQs, lo que conlleva una disminución del rango de trabajo del método en la zona de bajas concentraciones (6).

6.2. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN EN MUESTRAS AMBIENTALES

Los POPs, y entre ellos los PAHs, normalmente se encuentran a concentraciones extremadamente bajas en sedimentos y muestras de agua (de pg/L a ng/L) y en presencia de múltiples interferentes de la matriz (generalmente en mayores concentraciones que los propios analitos). La determinación de estos contaminantes también se caracteriza por la presencia de mezclas complejas de congéneres que pueden coexistir en las muestras (por ejemplo, 210 PCDD/Fs, 209 PCBs o 209 PBDEs) y los estrictos LOQs que exige la legislación vigente. Por todo ello, los métodos analíticos aplicados consisten habitualmente en procedimientos largos, exhaustivos, y con varias etapas (extracción, enriquecimiento y limpieza) antes del análisis instrumental.

Las técnicas de extracción más aplicadas han sido la LLE y la SPE en muestras acuosas, así como la SLE para los sedimentos. Más recientemente, empezaron a aplicarse técnicas de microextracción y miniaturizadas, caracterizadas por una reducción del volumen de muestra, consumo mínimo de disolvente orgánico y alto factor de enriquecimiento ⁽¹³⁹⁾. Entre éstas últimas cabe destacar la SPME, la extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras (SBSE) o la LPME para la determinación de niveles trazas de contaminantes orgánicos en muestras de aguas.

Adicionalmente en el análisis de POPs, especialmente cuando se determinan mezclas de congéneres, la falta de una limpieza adecuada durante el tratamiento de la muestra puede acarrear la presencia de numerosos interferentes y conllevar errores analíticos. La purificación sucesiva de los extractos de las muestras es considerada actualmente uno de los métodos más efectivos para este propósito; ésta consiste en la combinación de varios tipos de sorbentes y el posterior lavado del extracto obtenido a fin de eluir interferentes y separarlos de los analitos. Los procedimientos de limpieza más empleados suelen ser cromatografía de permeación en gel (GPC) o sistemas que combinan extracción y purificación y pueden automatizarse ⁽¹⁴⁰⁻¹⁴³⁾. A veces, los procedimientos de limpieza aplicados pueden no ser suficientes para eliminar totalmente el efecto matriz y es necesario aplicar estrategias como la calibración en matriz y/o el uso de analitos marcados isotópicamente.

En la **Figura 1.7** se muestra un esquema resumen del tratamiento de muestras de aguas y sedimentos para análisis de POPs, cuyas técnicas y procedimientos se abordarán con profundidad en los siguientes apartados.

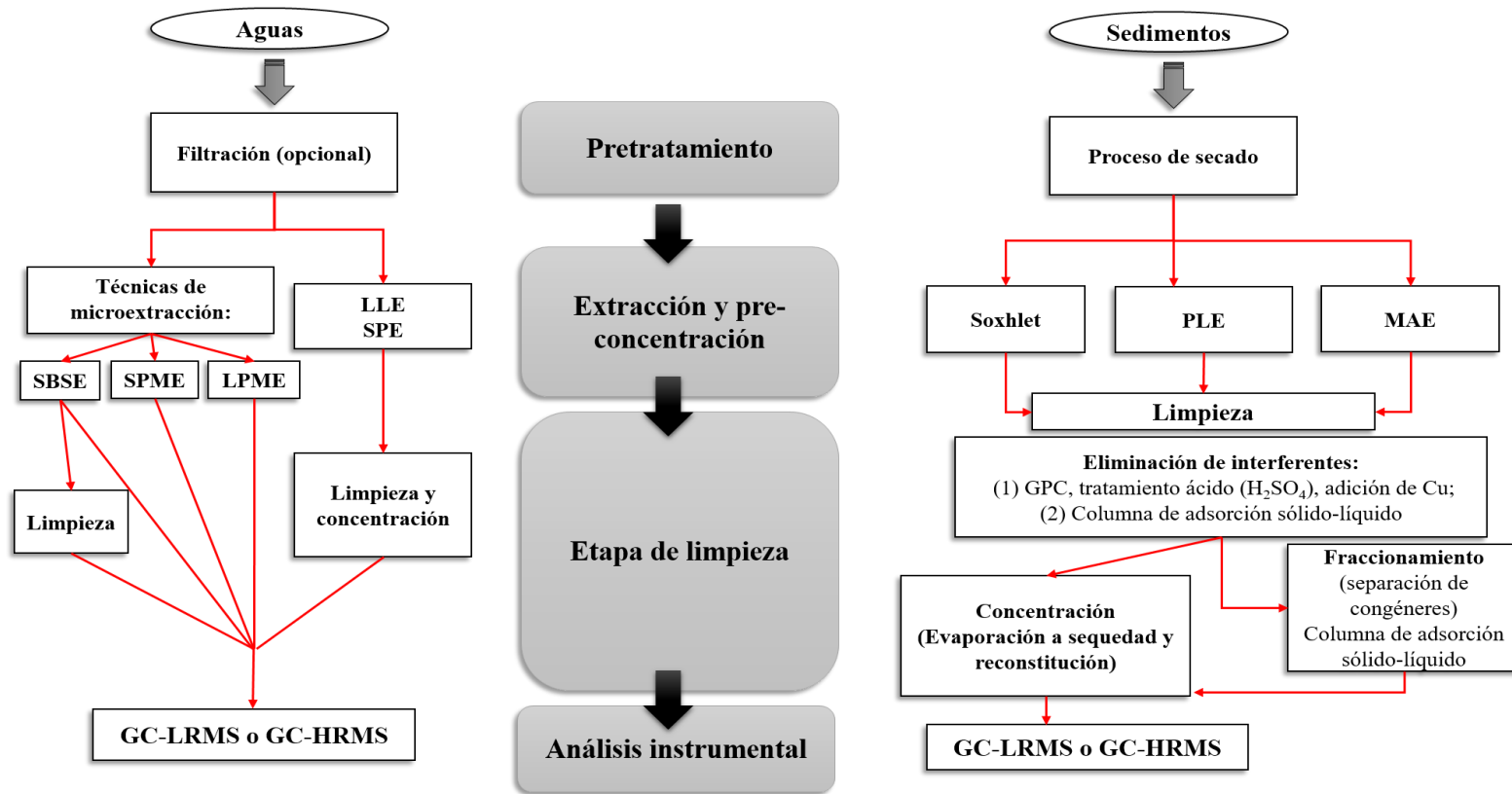


Figura 1.7. Resumen esquemático de las distintas etapas y principales técnicas utilizadas en el tratamiento de muestras de agua y sedimentos para análisis de POPs.

6.2.1. Contaminantes orgánicos persistentes en muestras de agua

Extracción líquido-líquido (LLE)

La LLE es un método clásico que ha sido muy aplicado en muestras de agua ⁽¹⁴⁴⁾, utilizándose en métodos de referencia tales como el Método 1613 de la EPA para la determinación de PCDD/Fs ⁽¹⁴⁵⁾. En la extracción de POPs usando esta técnica, los disolventes más comunes han sido hexano, diclorometano (DCM), isooctano y éter *tert*-butílico ⁽¹⁴⁰⁾. Por ejemplo, la LLE ha sido utilizada para la extracción de PCBs, PAHs y otros contaminantes en muestras de agua de río, empleando DCM primero y hexano después ⁽¹⁴⁴⁾, y aplicando una etapa final de limpieza con una columna de Florisil y gel de sílice ⁽¹⁴⁴⁾. No obstante, este método puede precisar el uso de grandes volúmenes de disolventes y de muestra a fin de lograr un factor de pre-concentración adecuado a la sensibilidad requerida ⁽¹⁴⁰⁾, por lo que su uso se ha visto reducido en la actualidad.

Extracción en fase sólida (SPE)

En este método la elección de sorbentes adecuados desempeña un papel fundamental a fin de obtener una elevada eficiencia de enriquecimiento. En particular, debido a la baja polaridad de los PAHs y del resto de POPs, un sorbente con una polaridad similar facilita dicho enriquecimiento. Por ello para la extracción de estos compuestos en agua, la opción preferente es la fase reversa de C18 ⁽³³⁾. Este sorbente representa una de las fases estacionarias más utilizadas ya que abarca un rango de aplicación muy amplio en SPE, permitiendo la extracción de compuestos apolares y moderadamente polares. Con la finalidad de lograr un mayor poder de elución de los analitos de la fase estacionaria se emplean disolventes orgánicos con baja polaridad, especialmente DCM, hexano y mezcla de ambos ⁽³³⁾, aunque también pueden usarse,

entre otros, acetona, acetonitrilo ⁽¹⁴⁰⁾ o metanol ⁽¹⁴⁶⁾ (**Tabla 1.10**). Así, la SPE con C18 se ha aplicado en la pre-concentración de 16 PAHs en agua de consumo, utilizando DCM como disolvente de elución y obteniéndose recuperaciones entre 70-85% ⁽³³⁾. También ha sido aplicada para la extracción de 8 PAHs en aguas medioambientales, eluyendo los analitos con metanol (recuperaciones 72-134%) ⁽¹⁴⁶⁾. No obstante, actualmente, otras fases estacionarias tales como OASIS-HLB ⁽³²⁾, Lichrolut o incluso nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) ⁽¹⁴⁷⁾ se están usando para ganar especificidad (**Tabla 1.10**). La SPE con OASIS HLB ha sido descrita para la determinación de PCBs, plaguicidas, PAHs y otros contaminantes en aguas residuales, utilizando acetato de etilo y hexano como disolventes de elución, con recuperaciones entre 80-125% ⁽³²⁾. Por su lado, la SPE con MWCNTs se ha aplicado al análisis de 16 PAHs en aguas medioambientales (elución con hexano), ofreciendo una adecuada eficiencia de extracción (recuperaciones 70-127%) ⁽¹⁴⁷⁾. Adicionalmente, en bibliografía se ha descrito el desarrollo de nuevos sorbentes basados en nanopartículas magnéticas cuyo uso minimiza o evita varias de las desventajas de la SPE convencional ⁽¹⁴⁸⁾.

La SPE en comparación con otras técnicas de desarrollo posterior, como por ejemplo SPME o SBSE, presenta un factor de enriquecimiento menor. En consecuencia, para conseguir LOQs bajos (<ng/L) en el análisis de POPs se requiere la concentración del extracto hasta un volumen reducido (<1 mL) ^(33,146), evaporar a sequedad (generalmente con N₂) ⁽¹⁴⁷⁾, y/o la inyección de grandes volúmenes (LVI) ^(32, 144) (**Tabla 1.10**). No obstante, el uso de esta técnica de extracción puede ocasionar la presencia de interferencias de fondo significativas y la obtención de una reproducibilidad deficiente ⁽¹⁴⁹⁾.

Tabla 1.10. *Resumen bibliográfico de los diferentes métodos de extracción de POPs, y en particular, PAHs, en muestras de agua.*

ANALITOS (NÚMERO)	MATRIZ	TRATAMIENTO DE MUESTRA	R (%)	REF.
PCBs (7), OCPs, HCB, PBDEs (11), otros contaminantes	Aguas superficiales, subterráneas, residuales	SPME (CW/DVB, 65 µm); extracción: NaCl (10%), agitación 45 min., temperatura ambiente; TD: 250°C, 5 min	N.D.	(152)
BDE-209	Agua del grifo y de lago	SDME (tolueno, 3 µL; agitación 15 min, 600 rpm)	93-103	(158)
PBDEs (4)	Agua de grifo, lago y lixiviados	DLLME (1 mL ACN, disolvente dispersivo; 20 µL tetracloroetano disolvente de extracción); agitación y centrifugación (5 min, 3000 rpm)	87-119	(159)
PCBs (18), OCPs (28), PAHs (16)	Agua de río	SPMD (LDPE 65 µm); SLE: agitación con ciclohexano toda la noche; secado de la fase orgánica (Na ₂ SO ₄); evaporación a sequedad y redisolución (hexano:DCM, 1:1) Limpieza: columna mixta de gel de sílice (sílice+ alúmina con 3% H ₂ O + Na ₂ SO ₄); SPE (C18); concentración a 20 µL	40-100 (IS deuterados)	(141)
PAHs (16)	Aguas medioambientales	SPE (MWCNTs); elución hexano (5 mL); evaporación a sequedad (N ₂); reconstitución hexano (1 mL)	70-127	(147)
PAHs (16)	Agua de consumo	Pre-concentración: SPE (C18); elución DCM; evaporación hasta 100 µL y redisolución isoocetano (200 µL)	70-85	(33)
OCPs (16), PCBs (3), PAHs y otros contaminantes	Agua de río	a) SBSE-TD: acetona, barras agitadoras (PDMS, 0,5 mm), temperatura ambiente, 1500 rpm, 3h. b) Adición NaCl (5%); LLE (3 x 0,5 L; DCM); adición hexano (0,5 L); secado (Na ₂ SO ₄); concentración a 3 mL; limpieza:	a) 25-95	(144; Error! Marcador no definido.)

ANALITOS (NÚMERO)	MATRIZ	TRATAMIENTO DE MUESTRA	R (%)	REF.
		columna cromatográfica (Florisil+gel sílice); concentración a 100 µL		
PCBs (16), PBBs (4), plaguicidas (16), PAHs (16), y otros contaminantes	Aguas residuales	Pre-concentración: SPE (OASIS-HLB, 200 mg); elución AcOEt + hexano; concentración/evaporación a 1 mL + adición isooctano Limpieza: SPE (Florisil, 1g); elución hexano:tolueno (65:35, v/v) y AcOEt:DCM:MeOH (40:40:20); evaporación a sequedad y reconstitución (hexano, 100 µL).	80-125	(32)
PAHS (8)	Aguas medioambientales	a) SPE (C18); elución MeOH (10 mL); concentración; reconstitución acetona (1 mL) b) MEPS (C18); elución MeOH	a) 72-134 b) 70-117	(146)
PAHs (16)	Aguas medioambientales	SPME (MIL-53 (Al, Cr, Fe); TD	70-125	(153)
PCBs (10), PAHs (12), PBDEs (6), plaguicidas (49)	Agua de río	Filtrado y adición de NaCl; SBSE-TD (PDMS, 10 mm) 800 rpm, 24h. TD (300°C, 8 min)	74-111	(151)
PAHs (15)	Agua del grifo, lluvia y río	DLLME (900 µL ACN, disolvente dispersivo; 100 µL tricloroetileno, disolvente de extracción)	89-106	(157)
PAHs (16)	Agua de mar	HF-LPME (fibras huecas porosas de polipropileno, SBME); hexano, 500 rpm agitación, 60 min	99	(155)
Plaguicidas (14), PAHs (16), BDEs (6), y PCBs (26)	Aguas superficiales	SPME (<i>on-line</i>) (100 µm PDMS, 85 µm PA, 65 µm PDMS-DVB); extracción: 75°C, 40 min; TD: 280°C, 3 min	84-118	(154)

ANALITOS (NÚMERO)	MATRIZ	TRATAMIENTO DE MUESTRA	R (%)	REF.
PAHs (10)	Agua de río, del grifo y de lluvia	Adición de NaCl (5%); SBDLME (MIL); agitación 10 min. Temperatura ambiente; TD	84-115	(139)

Abreviaturas. ACN: acetonitrilo; AcOEt: acetato de etilo; BDE-209: decabromodifenil éter; C18: octadecilsilano; CW/DVB: carbowax/divinilbenceno; DCM: diclorometano; DLLME: microextracción líquida-líquida dispersiva; HCB: hexaclorobenceno; HF-LPME: microextracción en fase líquida en fibra hueca; IS: estándar interno; LDPE: polietileno de baja densidad; LLE: extracción líquido-líquido; MeOH: metanol; MEPS: microextracción con sorbentes empaquetados; MIL: líquido iónico magnético; MWCNTs: nanotubos de carbono de pared múltiple; N.D.: no disponible; OCPs: plaguicidas organoclorados; PA: poliacrilato; PAHs: hidrocarburos aromáticos policíclicos; PBBs: bifenilos polibromados; PBDEs: difeniléteres bromados; PCBs: bifenilos policlorados; PDMS: polidimetilsiloxano; R: recuperación; SBDLME: microextracción dispersiva líquida de barras magnéticas agitadoras; SBME: microextracción en modo barra de solvente; SBSE: extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras; SDME: microextracción en gota; SLE: extracción sólido-líquido; SPE: extracción en fase sólida; SPMD: dispositivo de membrana semipermeable; SPME: microextracción en fase sólida; TD: desorción térmica.

Es importante mencionar también que una pre-concentración mediante SPE es mayoritariamente no específica, de manera que otros componentes de la matriz pueden co-eluir junto con los analitos de interés. Por ello, suele ser necesaria una etapa de limpieza en el caso de matrices complejas, como puede ser un agua residual. Esta limpieza puede llevarse a cabo mediante una segunda extracción por SPE, normalmente empleando cartuchos de sílice, aunque pueden emplearse otras fases estacionarias como NH_2 , PSA, CN o diol ⁽³²⁾ (**Tabla 1.10**). Por ejemplo, para el análisis de PCBs, plaguicidas, PAHs y otros contaminantes en aguas residuales se ha aplicado una SPE inicial, seguida de una limpieza con una segunda etapa de SPE con fase estacionaria de Florisil. La elución de los analitos se ha realizado primero con una mezcla de hexano:tolueno (65:35, *v/v*) y posteriormente con acetato de etilo:DCM:metanol (40:40:20, *v/v/v*) ⁽³²⁾ (recuperaciones 80-125%).

Adicionalmente, el desarrollo de métodos de LVI junto con la vaporización a temperatura programada (PTV), ha permitido acoplar el cromatógrafo de gases (GC) con dispositivos de SPE automáticos (capaces de llevar a cabo todo o parte del proceso de preparación de la muestra) ⁽¹⁴⁹⁾. Una modalidad de SPE totalmente automatizada (SPE *on-line*), denominada microextracción con sorbentes empaquetados (MEPS), se ha aplicado para la determinación de 8 PAHs en muestras de agua medioambientales con recuperaciones comprendidas en el rango de 70-117% ⁽¹⁴⁶⁾ (**Tabla 1.10**). En este estudio, la jeringa utilizada estaba equipada con un sorbente de C18, llevándose a cabo la elución de los analitos con metanol directamente en el inyector del GC.

Extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras (SBSE)

Como puede apreciarse en la **Tabla 1.10**, la SBSE ^(144,150-151) es una técnica miniaturizada que ha sido aplicada durante los últimos años para la extracción en agua de los analitos objeto de estudio en la presente Tesis. En el caso de la extracción con SBSE de compuestos apolares, como son los POPs en muestras acuosas, que pueden interaccionar con los componentes de la matriz de la muestra, a menudo se añade un modificador orgánico para minimizar dicha interacción, como metanol o acetona ⁽¹⁴⁴⁾. Así, para la determinación de PCBs, PAHs y otros contaminantes en agua de río se ha descrito un procedimiento de extracción con SBSE adicionando acetona ⁽¹⁴⁴⁾. Las barras agitadoras empleadas son de PDMS (polidimetilsiloxano; 0,5 mm), agitándose éstas dentro de la muestra acuosa a 1500 rpm durante 3 h a temperatura ambiente y sometiendo los analitos finalmente a un proceso de desorción térmica (TD) previo a su análisis instrumental (recuperaciones de 25-95%) ⁽¹⁴⁴⁾. Asimismo, PCBs, PAHs, PBDEs y plaguicidas fueron extraídos en agua de río aplicando SBSE (PDMS, 10 mm) ⁽¹⁵¹⁾, adicionando cloruro sódico y agitando durante 24 h (800 rpm). Finalmente, las barras agitadoras se sometieron a un proceso de TD de los analitos durante 8 minutos a 300°C, obteniéndose una recuperación de 74-111% ⁽¹⁵¹⁾.

Microextracción en fase sólida (SPME)

Métodos miniaturizados basados en SPME *on-line* con GC ⁽¹⁵²⁻¹⁵⁴⁾ han sido frecuentemente aplicados en agua para el análisis de contaminantes orgánicos durante los últimos años (**Tabla 1.10**). Esta técnica ha sido utilizada para análisis de algunos POPs, como PCBs, HCB y PBDEs en aguas superficiales, subterráneas y residuales, empleando como sorbente sólido carbowax/divinilbenceno (CW/DVB,

espesor 65 μm) ⁽¹⁵²⁾. La extracción se realizó adicionando cloruro sódico (para modificar la fuerza iónica e incrementar el rendimiento de la extracción), agitando 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se llevó a cabo la TD de los analitos en el puerto de inyección del GC a 250°C durante 5 minutos ⁽¹⁵²⁾. Esta TD presenta ventajas significativas para el análisis de trazas, ya que supone una menor pérdida de muestra y un riesgo menor de contaminación. Asimismo, la SPME *on-line* ha sido aplicada satisfactoriamente (recuperaciones 84-118%) en aguas superficiales para la determinación de plaguicidas, PAHs, PBDEs y PCBs ⁽¹⁵⁴⁾. En este estudio se llevó a cabo una comparación de la eficacia de extracción entre tres fibras de diferente polaridad: una apolar de PDMS (100 μm), una polar de PA (poliacrilato, 85 μm) y una fase mixta de PDMS-DVB (65 μm). Los autores concluyeron que la fibra de PA era la más adecuada para la extracción de las cuatro familias de compuestos en estudio. En este caso, la extracción se llevó a cabo durante 40 minutos a 75°C, mientras que la TD en el cromatógrafo se prolongó durante 3 minutos a 280°C ⁽¹⁵⁴⁾.

Adicionalmente, se han utilizado fibras de materiales sintetizados en laboratorio con el propósito de mejorar la estabilidad térmica e incrementar el rango de aplicaciones, como es el caso del sorbente de estructura metal-orgánica MIL-35 (Al, Cr, Fe). Dicho sorbente fue desarrollado para el análisis de PAHs en aguas medioambientales ⁽¹⁵³⁾, aplicándose también la TD y obteniéndose recuperaciones en el rango de 70-125%.

Microextracción en fase líquida (LPME)

Dentro de la LPME, se pueden distinguir varios tipos de técnicas de extracción que han sido aplicadas para aislar y pre-concentrar contaminantes orgánicos en muestras acuosas: microextracción en gota

(SDME), en fibra hueca (HF-LPME) ⁽¹⁵⁵⁾ y microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) ^(156,157) (**Tabla 1.10**).

La SDME ha sido aplicada para la extracción de decabromodifenil éter (BDE-209) en muestras de agua del grifo y de lago, obteniéndose recuperaciones entre 93-103% ⁽¹⁵⁸⁾ (**Tabla 1.10**). Como disolvente de extracción se utilizó tolueno, siendo el volumen de la gota de disolvente empleado de 3 μ L, con un tiempo de extracción de 15 minutos y una velocidad de agitación de 600 rpm (sin adición de sales o necesidad de modificar el pH de la muestra).

Por otro lado, la HF-LPME se ha aplicado al análisis de 16 PAHs en agua de mar, obteniéndose una recuperación promedio del 99% ⁽¹⁵⁵⁾. En este caso, la HF-LPME (con fibras huecas porosas de polipropileno) ha sido llevada a cabo en modo barra de solvente (SBME), utilizando hexano como disolvente orgánico impregnando los poros de la fibra y agitando la barra dentro de la muestra acuosa a una velocidad de 500 rpm durante 60 minutos.

En cuanto a la DLLME, se ha estudiado la optimización de la extracción de 4 PBDEs (bromodifeniléter-, BDE-28, 47, 99 y 209) en muestras acuosas (agua de grifo, de lago y lixiviado) ⁽¹⁵⁹⁾. En este trabajo se evaluaron distintos factores que pueden influir en la eficiencia de extracción: los disolventes dispersivos y de extracción, el volumen empleado de éstos, el tiempo de extracción y el efecto salino ⁽¹⁵⁹⁾. En la selección del disolvente de extracción se tuvo en cuenta que deben cumplirse varios requisitos: que posea mayor densidad que el agua y baja solubilidad en ésta, alta capacidad de extracción de los compuestos de interés y un comportamiento cromatográfico adecuado ⁽¹⁵⁹⁾. Como disolventes de extracción se evaluaron dicloroetano, disulfuro de carbono, tetracloruro de carbono y tetracloroetano. En cuanto al

disolvente dispersivo, el principal aspecto a considerar para su selección es su miscibilidad con la fase acuosa (muestra) y la fase orgánica (disolvente de extracción). En este caso, se evaluaron metanol, tetrahidrofurano, acetona y acetonitrilo. Finalmente, se concluyó que las condiciones óptimas de extracción (recuperaciones 87-119%) se alcanzaron inyectando a la muestra acuosa una mezcla de 20 μ L de tetracloroetano (disolvente de extracción) y 1 mL de acetonitrilo (disolvente dispersivo), realizando una extracción con agitación (5 minutos) y sin adición de cloruro sódico ⁽¹⁵⁹⁾.

Análogamente, la DLLME fue optimizada para la determinación de 15 PAHs en muestras acuosas (agua de grifo, de lluvia y de río) ⁽¹⁵⁷⁾. Los mejores resultados se observaron inyectándose a la muestra una mezcla de tricloroetileno (como disolvente de extracción) y acetonitrilo (como disolvente dispersivo). Se obtuvieron recuperaciones comprendidas en el rango de 89-106% (**Tabla 1.10**).

Asimismo, una combinación de la DLLME y la SBSE, denominada microextracción dispersiva líquida de barras magnéticas agitadoras (SBDLME), ha sido aplicada a la determinación de 10 PAHs en tres tipos de aguas naturales ⁽¹³⁹⁾ (**Tabla 1.10**). En este caso, la extracción se llevó a cabo utilizando una barra de agitación de neodimio recubierta magnéticamente con un líquido magnético iónico (MIL) como dispositivo de extracción, dispersándose dicho MIL en la solución a altas velocidades de agitación. Finalmente, la barra se sometió a TD de los analitos en un sistema de GC acoplada a MS (GC-MS). Se obtuvieron valores de recuperación satisfactorios (84-115%) en agua de río, grifo y de lluvia ⁽¹³⁹⁾.

6.2.2. Contaminantes orgánicos persistentes en muestras de sedimentos

El control de la presencia de POPs en el medio ambiente se focaliza a menudo en el análisis de los sedimentos, medio en el que se encuentran a una mayor concentración que en agua debido al elevado carácter hidrofóbico de estos contaminantes. No obstante, la extracción de los POPs de los sedimentos presenta varias dificultades ya que se trata de una matriz de gran complejidad (**Figura 1.7**).

Etapa de extracción

Soxhlet, que tradicionalmente ha sido el método de extracción más utilizado para POPs en sedimentos (^{65,142,143,160-162}) (**Tabla 1.11**), continúa aplicándose actualmente en laboratorios de rutina, debido a su simplicidad y bajo coste. Los sedimentos tienen que ser secados previamente a la extracción, lo que se lleva a cabo mezclando la muestra con sulfato de sodio (tiempo de secado 1-2 h) o bien dejándolos secar al aire (³¹). Generalmente, después de la extracción con este método, se requiere una etapa exhaustiva de limpieza (^{142,143,162}). La técnica de extracción Soxhlet ha sido aplicada para análisis de PCDD/Fs, PCBs y PBDEs en sedimentos y lodos de depuradora utilizando una mezcla de DCM y hexano (1:1, *v/v*) durante 24 h, obteniendo recuperaciones comprendidas entre 60-120% (¹⁶¹). Acetona ha sido también empleada como disolvente de extracción en Soxhlet (16 h de extracción) para determinación de OCPs, hexaclorociclohexanos (HCHs) y HCB en sedimentos (recuperación 50-120%) (¹⁶²). Tolueno ha sido el disolvente más frecuentemente usado para extracción de POPs mediante Soxhlet en sedimentos, aplicándose en diferentes estudios (**Tabla 1.11**): extracción de los 17 congéneres de PCDD/Fs y PCBs similares a las dioxinas (*dl*-PCBs) (¹⁴³); PCDD/Fs y HCB (extracción durante 16 h,

recuperaciones 80-120%) (65); PCDD/Fs, PCBs y otros contaminantes (Soxhlet durante 24 h, recuperaciones 40-120% de los estándares internos (IS) subrogados marcados isotópicamente) (142); 17 PCDD/Fs y 18 PCBs (8 h de extracción, recuperaciones $80 \pm 18\%$ para los PCDD/Fs marcados isotópicamente y $78 \pm 18\%$ para los PCBs) (160).

Otras técnicas alternativas (**Tabla 1.11**) como son la extracción asistida por microondas (MAE) (143) y la extracción con líquidos presurizados (PLE) (38,163-165), también han sido aplicadas en sustitución del Soxhlet, con una reducción del tiempo de extracción. Por ejemplo, PCDD/Fs y *dl*-PCBs han sido eficazmente extraídos mediante MAE en muestras de sedimentos utilizando una mezcla de tolueno:metanol (9:1, *v/v*) (143). Asimismo, para estos compuestos (PCDD/Fs y *dl*-PCBs) se ha aplicado la PLE como técnica de extracción, con una mezcla de tolueno:acetona (70:30, *v/v*), obteniéndose recuperaciones de 30-140% (164). Esta misma mezcla de disolventes ha sido adicionalmente utilizada para la extracción mediante PLE (presión 100 bares, 120°C) de una amplia gama de contaminantes orgánicos en sedimentos, entre los que se encuentran PCDD/Fs, PCBs, PBDEs, bifenilos polibromados (PBBs), hexabromociclododecano (HBCD) y OCPs (recuperaciones: 60-120%) (38).

Etapas de limpieza

El método más aplicado para la limpieza de extractos de sedimentos es la SPE mediante cromatografía de “sorción” sólido-líquido, utilizando una o varias columnas multicapa, cargadas con varias combinaciones de los sorbentes necesarios (38,65,142,143,161) (**Tabla 1.11**). Para eliminar los co-extractantes no volátiles se aplican sorbentes de gel de sílice acidificado, neutro y básico, así como sorbentes basados en sílice y alúmina (31,65,142,161,165).

Tabla 1.11. Resumen bibliográfico de las técnicas de extracción empleadas para la extracción de POPs en sedimentos.

ANALITOS (N°)	TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	R (%)	REF.
PCDD/Fs (17); PCBs (18), PBDEs (16)	-Secado en frío; Soxhlet (DCM:hexano, 1:1, <i>v/v</i> , 150 mL, 24h) - <u>Limpieza</u> : (1) adición de sílice ácida y polvo de Cu; concentración y redisolución (hexano); (2) columna multicapa de gel de sílice (gel sílice activada, básica y ácida, AgNO ₃ -gel sílice, Na ₂ SO ₄); elución 2% DCM/hexano (PCBs+PCDD/Fs) y DCM:hexano, 1:1, <i>v/v</i> (PBDEs); (3) PBDEs: columna de alúmina básica; PCBs+PCDD/Fs: columna alúmina básica + Florisil; elución 5%DCM/hexano (PCBs) y DCM (PCDD/Fs); (4) GPC (para PCBs)	PCBs: 62-105 PCDD/Fs: 72-120 PBDEs: 60-101	(161)
OCPs (17), HCHs (4), HCB	-Secado de los sedimentos; Soxhlet (300 mL acetona, 16h); concentración; - <u>Limpieza</u> : LLE (hexano); concentración; SPE (i) Florisil; (ii) carbón activo (ENVI-Carb); concentración	50-120	(162)
PCDD/Fs (17), <i>dl</i> -PCBs	a) Liofilización; Soxhlet (tolueno) - <u>Limpieza</u> : (1) columna de Na ₂ SO ₄ +gel sílice; (2) columna de carbón activo y celita; (3) columna de óxido de aluminio; precipitación de S con polvo de Cu activo b) Secado; Soxhlet (tolueno) - <u>Limpieza</u> : columna cromatográfica de gel sílice/NaOH/gel sílice/H ₂ SO ₄ , Al ₂ O ₃ ácido, carbón activo AX-21/Celita c) Secado; MAE (tolueno:MeOH, 9:1) - <u>Limpieza</u> : columna cromatográfica (columna sílice/columna alúmina/carbón activo/columna de Celita)	N.D.	(143)

ANALITOS (N°)	TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	R (%)	REF.
PCDD/Fs, <i>dl</i> -PCBs, OCPs (7), HCB	<p>(a) PCDD/Fs, HCB: secado al aire; Soxhlet (tolueno, 16h)</p> <p>- <u>Limpieza</u>:</p> <p><i>i</i>) tratamiento ácido (H₂SO₄);</p> <p><i>ii</i>) columna multicapa de gel de sílice (Na₂SO₄, gel sílice, KOH-gel sílice (30%), gel de sílice, H₂SO₄-gel de sílice (44%), gel de sílice, AgNO₃-gel de sílice (10%), Na₂SO₄) + columna de alúmina (PCDD/Fs, HCB); elución con hexano (HCB) y 50% DCM en hexano (PCDD/Fs)</p> <p>(b) OCPs: Soxhlet (DCM, 16h)</p> <p>- <u>Limpieza</u>: columna gel de sílice/alúmina, DCM</p> <p>(c) <i>dl</i>-PCBs: Método EPA 1668</p> <p>- <u>Limpieza</u>: columna multicapa gel de sílice + columna de alúmina, elución 50% DCM en hexano</p>	<p>(a) PCDD/Fs y HCB: 80-120;</p> <p>(b) OCPs: 77-110</p> <p>(c) <i>dl</i>-PCBs: 80-90</p>	(65)
PCDD/Fs, PCBs, otros contaminantes	<p>Soxhlet (tolueno, 24h); evaporación hasta peso constante</p> <p>- <u>Limpieza</u>:</p> <p>(1) columna multicapa de sílice (Na₂SO₄ anhidro + gel sílice + 44% (w/w) H₂SO₄/gel sílice + gel sílice + 10% AgNO₃/sílice + Na₂SO₄ anhidro), elución hexano;</p> <p>(2) columna de alúmina activa, elución con DCM:hexano, 1:1, <i>v/v</i> (PCDD/Fs) y 5% DCM en hexano (PCBs y otros); concentración</p>	40-120 (IS subrogados)	(142)
a) PCDD/Fs (17) b) <i>dl</i> -PCBs (12)	<p>PLE (tolueno: acetona, 70:30, <i>v/v</i>)</p> <p>- <u>Limpieza</u>: columnas cromatográficas de sílice, Florisil y celita/carbón</p>	30-140	(164)
PCDD/Fs (17), PCBs (18)	<p>- Soxhlet (tolueno, 8h); concentración; adición de hexano y filtración</p> <p>- <u>Limpieza</u>: Power-Prep™ (columna multicapa de sílice, alúmina básica y columna de carbón activo <i>PX-21</i>); concentración a sequedad y reconstitución (<i>n</i>-nonano)</p>	¹³ C ₁₂ -2,3,7,8-PCDD/Fs: 80±18	(160)

ANALITOS (N°)	TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	R (%)	REF.
		¹³ C ₁₂ -PCBs: 78±18	
PCDD/Fs (17), PCBs (7), PBDEs (8), PBBs (3), HBCD (3), OCPs (31)	PLE (tolueno/acetona, 70/30, <i>v/v</i> 100 bar, 120°C); evaporación a sequedad, redisolución (hexano) - <u>Purificación:</u> a) PCBs, PBDEs, PCDD/Fs: columnas de (1) sílice ácida (eliminación de interferentes con H ₂ SO ₄), (2) Florisil (purificación de PCBs y PBDEs) (3) celita/carbón (separación de <i>dl</i> -PCBs y PCDD/Fs); evaporación a sequedad; reconstitución (tolueno); b) OCPs: GPC (Bio-Beads S-x3, AcOEt/ciclohexano (50/50; <i>v/v</i>))	60-120	(³⁸)

Abreviaturas. AcOEt: acetato de etilo; DCM: diclorometano; *dl*-PCBs: bifenilos policlorados similares a las dioxinas; EPA: Agencia de Protección Ambiental; GPC: cromatografía por exclusión o permeación de gel; HBCD: hexabromociclododecano; HCB: hexaclorobenceno; HCH: hexaclorociclohexano; IS: estándar interno; LLE: extracción líquido-líquido; MAE: extracción asistida por microondas; MeOH: metanol; N.D.: no disponible; OCPs: plaguicidas organoclorados; PBBs: bifenilos polibromados; PBDEs: difeniléteres bromados; PCBs: bifenilos policlorados; PCDD/Fs: dioxinas y furanos; PLE: extracción con líquidos presurizados; R: recuperación; SPE: extracción en fase sólida.

Otros tratamientos llevados a cabo como es la eliminación del azufre elemental (principal co-extractante presente en sedimentos), se puede realizar utilizando GPC o por reacción con cobre (generalmente polvo de cobre) y la consecuente precipitación de éste como sulfuro de cobre (31,143).

Como puede apreciarse en bibliografía (**Tabla 1.11**), para el análisis de PCDD/Fs, *dl*-PCBs, OCPs y HCB en sedimentos se han aplicado diferentes procedimientos de limpieza tras la extracción (65). En el caso de los PCDD/Fs y HCB, tras someter la muestra a un tratamiento ácido (LLE con disolución de ácido sulfúrico para eliminar los interferentes de la matriz remanentes), el extracto se pasó por una columna multicapa de gel de sílice y una columna de alúmina. La primera fracción eluída con hexano de la columna de alúmina contenía HCB y la segunda con DCM al 50% en hexano, PCDD/Fs (recuperaciones 80-120%) (65). Para los *dl*-PCBs la purificación se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento pero descartando la primera fracción de hexano, y eluyendo los compuestos de interés en la segunda con DCM en hexano (recuperaciones: 80-90%). Finalmente, los OCPs fueron purificados empleando también columnas de sílice y alúmina (recuperaciones: 77-110%) (65).

Además, puede llevarse a cabo una etapa adicional para separar los compuestos planares (por ejemplo, los PCDD/Fs o los *dl*-PCBs) de los no planares (por ejemplo, los PCBs) incluyendo un material basado en carbón (38,165), como carbón activo (143), carbón poroso grafitizado (PGC), o una columna de 2-(1-pirenil)etildimetilsililo al final de la etapa de limpieza (31). El procedimiento habitual empleando columnas de carbón consiste en la elución de algunos grupos de contaminantes no polares usando un disolvente apolar (por ejemplo, hexano) y la elución con

tolueno del resto de compuestos de interés en dirección reversa a los primeros ⁽³¹⁾. La **Figura 1.8** esquematiza un ejemplo de separación de este tipo de compuestos en muestras de sedimentos ⁽¹⁶⁵⁾.

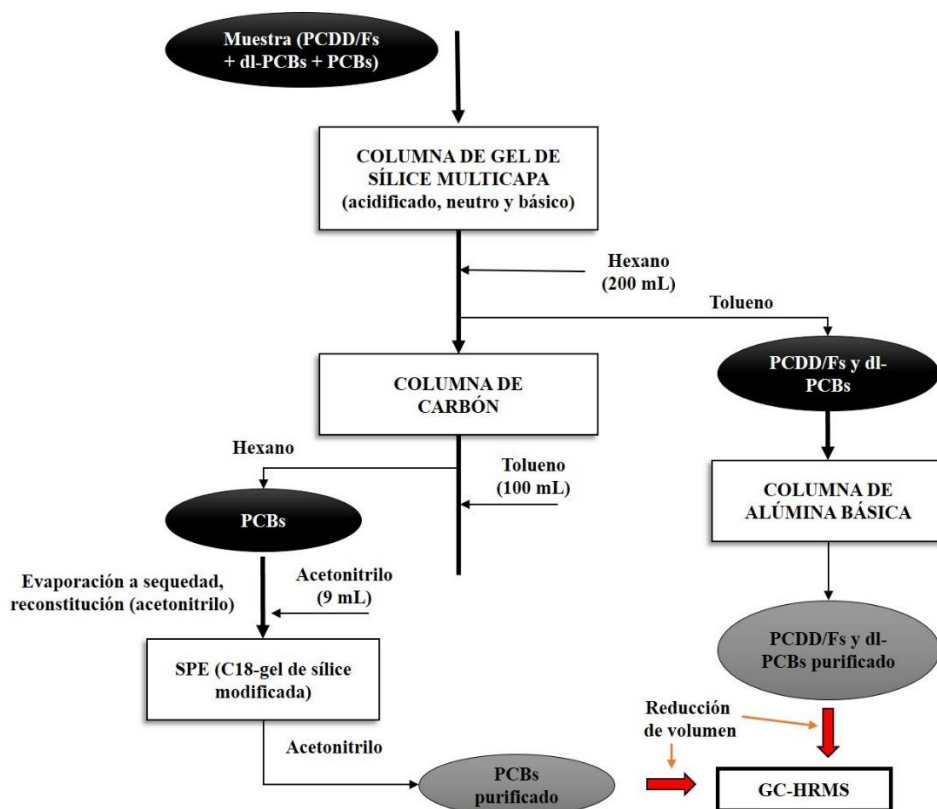


Figura 1.8. Ejemplo de etapa de limpieza mediante columnas de adsorción sólido-líquido aplicada para separar PCBs de PCDD/Fs y dl-PCBs en muestras de sedimentos ⁽¹⁶⁵⁾.

Sin embargo, cuando se realiza un análisis simultáneo de PBDEs, PCBs y PCDD/Fs, la separación de todos los grupos resulta muy complicada, dificultando el análisis cromatográfico, independientemente del detector usado. Dicha separación de estos grupos de contaminantes (PBDEs, PCBs y PCDD/Fs) en tres fracciones independientes ha sido descrita incluyendo sílice-nitrato de plata dentro de una columna de sílice multicapa, seguida por columnas de alúmina básica y Florisil

conectadas ⁽¹⁶¹⁾. El método de limpieza, tras la extracción con Soxhlet, se basó en la adición de sílice ácida y polvo de cobre para eliminar los lípidos y el azufre de las muestras de sedimentos ⁽¹⁶¹⁾. Tras concentrar dichas muestras y redissolver en hexano, los extractos se hicieron pasar a través de la columna de sílice multicapa, obteniéndose dos fracciones diferentes: la fracción de PCBs y PCDD/Fs (eluida con 2% DCM/hexano) y la de PBDEs (DCM: hexano, 1:1, *v/v*). Esta fracción de PBDEs se purificó utilizando una segunda columna de alúmina básica, obteniéndose recuperaciones entre 60-101% ⁽¹⁶¹⁾. Adicionalmente, para separar los PCBs de los PCDD/Fs contenidos en la primera fracción, se hizo pasar dicho extracto secuencialmente a través de 2 columnas: una primera de alúmina básica y una segunda de Florisil. Así, los PCBs fueron eluidos con una mezcla de 5% DCM/hexano y sometidos a limpieza adicional mediante GPC (recuperaciones 62-105%). Los PCDD/Fs fueron finalmente eluidos con DCM de la columna de Florisil, y sometidos directamente al análisis cromatográfico (recuperaciones: 72-120%) ⁽¹⁶¹⁾.

No obstante, como opción alternativa a los métodos de limpieza antes descritos, se encuentra el sistema automatizado *Power-Prep™* de *Fluid Management System™* (constituido por columna multicapa de sílice, alúmina básica y columna de carbón activo *PX-21*), que ha sido también aplicado en muestras de sedimentos para el análisis de 17 PCDD/Fs y 18 PCBs ⁽¹⁶⁰⁾, obteniéndose recuperaciones en el rango de 60-98%.

Por otro lado, para el análisis en sedimentos de otros compuestos pertenecientes al extenso grupo de los POPs, pueden aplicarse otras estrategias de limpieza basadas en LLE (con hexano, agua y H₂SO₄) seguida por una SPE (**Tabla 1.11**). Así, para la determinación de OCPs, HCHs y HCB, se usó como etapa de limpieza una LLE (con hexano)

seguida de dos etapas mediante SPE, usando primero Florisil y a continuación carbón activo (ENVI-Carb) como fases estacionarias (recuperaciones: 50-120%) ⁽¹⁶²⁾.

Sin embargo, la PLE permite unificar el proceso de extracción y de limpieza en una sola etapa, rellenando la celda de extracción con la muestra y los sorbentes adecuados. Por ejemplo, se ha utilizado carbón grafitico poroso con la finalidad de retener compuestos planares (PCDD/Fs y *dl*-PCBs) y selectivamente separarlos de los que no lo son ⁽³¹⁾.

7. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

Actualmente, las técnicas cromatográficas acopladas a los sistemas de detección de MS son la primera opción en los laboratorios de rutina para la determinación simultánea de diversos tipos de contaminantes y residuos en muestras alimentarias y ambientales.

En la presente Tesis se hace uso de la LC acoplada a MS de baja resolución (LRMS) para el análisis de nitrofuranos y plaguicidas en muestras alimentarias (productos del mar y fruta procesada, respectivamente). Asimismo, se aplica la GC acoplada a LRMS y MS de alta resolución (HRMS) para el estudio de PAHs y POPs en muestras ambientales.

7.1. NITROFURANOS Y PLAGUICIDAS EN MUESTRAS ALIMENTARIAS

7.1.1. Cromatografía de líquidos

Debido a las diferentes características químico-físicas (polaridad, volatilidad, estabilidad, etc.) que presentan los plaguicidas, tanto la técnica de GC ^(129,134) (plaguicidas apolares o semi-polares) como la de LC ^(23-26,61,128) (polares, semi-polares y media-baja volatilidad) han sido

aplicadas al análisis de plaguicidas en frutas procesadas (23,166). Los métodos de LC-MS/MS suelen abarcar carbamatos, fenilureas, anilidas, triazoles, lactonas macrocíclicas, neonicotinoides, estrobilurinas, triazinas y organofosforados relativamente polares, entre otros plaguicidas (166). Con respecto a los medicamentos veterinarios, éstos son generalmente compuestos bastante polares y termolábiles, por lo que LC es también la técnica predominante para su determinación en alimentos (12).

Es un hecho conocido que en esta técnica instrumental la separación de los analitos entre sí y de los componentes de la matriz depende de la columna analítica y la fase móvil utilizada. Asimismo, la optimización de estos factores representa todavía hoy en día un desafío debido a la extensa cantidad de interferentes de las complejas muestras alimentarias. En este contexto, las **Tablas 1.12** y **1.13** aportan un resumen de los métodos instrumentales basados en el uso de LC encontrados en bibliografía para el análisis de nitrofuranos en productos del mar y de plaguicidas en frutas procesadas, respectivamente. En ambas tablas puede apreciarse los principales parámetros cromatográficos optimizados: fase móvil, modo de elución, fase estacionaria, flujo de trabajo, volumen de inyección y tiempo total de análisis.

En LC se utiliza una amplia variedad de fases móviles, dependiendo del sistema de detección empleado. Con MS es habitual el uso de mezclas de agua-metanol y acetonitrilo, a diferentes valores de pH, evitando fases móviles que puedan contener compuestos no volátiles tales como tampones fosfato, ya que pueden obstruir la interfaz y producir acumulación de depósitos en la fuente de iones (41). Acetato, formiato y ácido fórmico suelen añadirse a la mezcla para favorecer la ionización.

Tabla 1.12. *Resumen de métodos instrumentales aplicados al análisis de nitrofuranos en productos del mar.*

TÉCNICA ANÁLISIS (MODO DE ADQUISICIÓN)	FASE MÓVIL & MODO DE ELUCIÓN	FASE ESTACIONARIA	FLUJO (mL/min)	VOLUMEN INYECCIÓN (μL)	t _A (min)	LOD & CCα/β	REF.
LC-ESI-MS/MS (MRM)	Formiato amónico (10 mM) y MeOH Elución: gradiente	C18 (150 mm × 2,0 mm × 3,0 μm)	0,2	10	25	CCα: 0,1-0,7 μg/kg CCβ: 0,1-0,9 μg/kg	(124)
a) LC-DAD (308-310 nm) b) LC-APCI-MS/MS (MRM)	a) Acetato amónico (5 mM, pH 7,5) y ACN b) Formiato amónico (0,2 mM) y MeOH Elución: gradiente	C18 (250 mm × 4,6 mm × 5,0 μm)	1,0	a) 10 b) 20	a) 40 b) 45	a) LOD: 0,70-0,91 μg/kg b) LOD: 0,16-0,27 μg/kg	(127)
LC-ESI-MS/MS (SRM)	Ácido acético (0,02%) y ACN-ácido acético (0,02%) Elución: gradiente	C18 (150 mm × 2,0 mm × 3,0 μm)	0,2	20	12	LOD: 1,0-2,0 ng/g CCα: 1,2-1,9 ng/g CCβ: 3,0-3,4 ng/g	(15)
a) LC-FLD (395-463 nm) b) LC-ESI-MS/MS (MRM)	a) 10mM H ₃ BO ₃ -NaOH + ACN (1:1, v/v, pH 9.4) y (10 mM) H ₃ BO ₃ -NaOH (pH 10,4) b) Ácido fórmico (0,1%)-formiato amónico (0,5 mM) y ACN	a) C18 (250 mm × 4,6 mm × 6,0 μm) b) C18 (150 mm × 4,6 mm × 3,5 μm)	a) 1,0 b) 0,3	20 (a y b)	20 (a y b)	a) LOD: 0,20-0,26 μg/kg b) LOD: 0,12-0,21 μg/kg	(53)

TÉCNICA ANÁLISIS (MODO DE ADQUISICIÓN)	FASE MÓVIL & MODO DE ELUCIÓN	FASE ESTACIONARIA	FLUJO (mL/min)	VOLUMEN INYECCIÓN (μL)	t_A (min)	LOD & CC α/β	REF.
	Elución: gradiente						
LC-APCI-MS/MS (SRM)	Acetato amónico (8,5 mM)-ácido fórmico (0,1%) y MeOH Elución: isocrático	C18 (50 mm × 4,6 mm × 1,8 μm)	0,6	10	6	LOD ≤ 0,06 ng/g	(54)
LC-ESI-MS/MS (MRM)	Acetato amónico (10 mM)-MeOH (30%) y MeOH (95%)-agua Elución: gradiente	Inertsil ODS-3 (C18, 50 mm × 2,1 mm × 5,0 μm)	N.D.	10	8,25	N.D.	(125)
LC-ESI-MS/MS (SRM)	Formiato amónico (4 mM, 18%)-agua-ácido fórmico (0,05%) y formiato amónico (4mM)-MeOH-ácido fórmico (0,05%) Elución: gradiente	Inertsil ODS-3 (C18, 150 mm × 2,0 mm × 5,0 μm)	0,3	N.D.	9,5	LOD: 0,005-0,069 ng/g	(126)
UHPLC-ESI-HRMS (MS/MS-SRM y <i>full-scan</i>)	Acetato amónico (10 mM)-NH ₄ OH (25%) y MeOH Elución: gradiente	C18 (50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm)	0,4	10	8	CC α : 0,01 μg/kg CC β : 0,02 μg/kg	(122)

TÉCNICA ANÁLISIS (MODO DE ADQUISICIÓN)	FASE MÓVIL & MODO DE ELUCIÓN	FASE ESTACIONARIA	FLUJO (mL/min)	VOLUMEN INYECCIÓN (μL)	t_A (min)	LOD & CC α/β	REF.
LC-ESI-MS/MS (MRM)	Ácido fórmico (0,1%) y ACN-ácido fórmico (0,1%) Elución: gradiente	C18 (150 mm × 2,1 mm × 1,7 μm)	0,2- 0,4	N.D.	20	LOD: 0,25-1,0 ng/g	(123)

Abreviaturas: ACN: acetonitrilo; APCI: ionización química a presión atmosférica; CC α : límite de decisión; CC β : capacidad de detección; C18: octadecilsilano; DAD: detector diodo array; ESI: electrospray; FLD: detector de fluorescencia; HRMS: espectrometría de masas de alta resolución; LC: cromatografía de líquidos; LOD: límite de detección; MeOH: metanol; MRM: monitorización de reacciones múltiples; MS/MS: espectrometría de masas en tándem; N.D: no disponible; SRM: monitorización de reacciones seleccionadas; t_A : tiempo de análisis; UHPLC: cromatografía de líquidos de ultra alta presión.

Tabla 1.13. Resumen de métodos instrumentales aplicados al análisis de plaguicidas en fruta procesada.

Nº DE ANALITOS	TÉCNICA ANÁLISIS (MODO ADQUISICIÓN)	FASE MÓVIL	FASE ESTACIONARIA	FLUJO	VOLUMEN INYECCIÓN (µL)	t_A (min)	LOQ/ LOD/ RL	REF
24	LC-ESI-MS/MS (MRM)	Agua-ácido fórmico (0,1%) y ACN	Fase reversa (150 mm × 2,0 mm × 4,0 µm)	0,25 mL/min	40	20	LOQ: 1-20 µg/kg	(128)
12	LC-ESI-MS/MS (MRM)	Formiato amónico (10 mM) y MeOH/ agua	C18 (150 mm × 4,6 mm × 5,0 µm) Pre-columna C18 (4,0 mm × 2,0 mm)	0,4 mL/min	N.D.	40	LOQ: 0,1-4,6 µg/L LOD: 0,03-1,2 µg/L	(24)
90	UHPLC-ESI-MS/MS (MRM)	Agua-ácido fórmico (0,01%) y MeOH	C18 (100 mm × 2,1 mm × 1,7 µm)	0,35 mL/min	5	11	LOQ < 5 µg/L LOD < 0,7 µg/L	(25)
53	LC-ESI-MS/MS (sMRM)	Agua-ácido fórmico (0,1%) y ACN	C8 (150 mm × 4,6 mm × 5,0 µm)	0,6 mL/min	5	15	RL: 0,1-10 µg/L	(23)
99	µLC-ESI-MS/MS (sMRM)	Agua-ácido fórmico (0,1%) y ACN-ácido fórmico (0,1%)	C18 (50 mm × 0,5 mm × 2,7 µm)	30 µL/min	3	14	RL: 9-45 µg/kg	(26)
74	UHPLC-ESI-MS/MS (SRM)	Agua-MeOH-ácido fórmico	C18 (50 mm × 2,1 mm × 1,7 µm)	0,25 mL/min	10	10	LOQ 4,9-26 µg/L	(61)

Nº DE ANALITOS	TÉCNICA ANÁLISIS (MODO ADQUISICIÓN)	FASE MÓVIL	FASE ESTACIONARIA	FLUJO	VOLUMEN INYECCIÓN (µL)	t _A (min)	LOQ/ LOD/ RL	REF
		(0,1%) y MeOH-fórmico (0,1%)					LOD 3-7,6 µg/L	
64	Nano-LC-ESI-HRMS	Agua-ácido fórmico (0,1%) y ACN-ácido fórmico (0,1%)	C18 (150 mm × 75 µm × 3,0 µm, 100 Å); Pre-columna: C18 (20 mm × 75 µm × 3,0 µm, 100Å,)	300 nL/min	1	48	LOQ < 0,114 µg/kg	(20)

Abreviaturas. ACN: acetonitrilo; C8: octilsílico; C18: octadecilsilano; ESI: electrospray; HRMS: espectrometría de masas de alta resolución; LC: cromatografía de líquidos; LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación; MeOH: metanol; MRM: monitorización de reacciones múltiples; MS/MS: espectrometría de masas en tándem; N.D: no disponible; RL: límite informado (*reporting limit*); sMRM: modo de monitorización de reacciones múltiples programado; SRM: monitorización de reacciones seleccionadas; t_A: tiempo de análisis; UHPLC: cromatografía de líquidos de ultra alta presión.

Para el análisis de nitrofuranos (**Tabla 1.12**) se han utilizado diversas combinaciones de fases móviles; como fase acuosa se han empleado formiato amónico -0,2⁽¹²⁷⁾ y 10 mM⁽¹²⁴⁾-, acetato amónico (8,5 mM) con ácido fórmico (0,1%)⁽⁵⁴⁾, acetato amónico (10 mM) con metanol (30%)⁽¹²⁵⁾, ácido acético al 0,02%⁽¹⁵⁾, formiato amónico -0,5 mM⁽⁵³⁾, 4 mM⁽¹²⁶⁾- con ácido fórmico -0,1%⁽⁵³⁾, 0,05%⁽¹²⁶⁾-, acetato amónico (10 mM) con hidróxido amónico (25%)⁽¹²²⁾ o incluso ácido fórmico al 0,1%⁽¹²³⁾. Por otro lado, metanol^(54,122,124,127), metanol al 95% con agua⁽¹²⁵⁾, metanol con formiato amónico (4 mM) acidificado con ácido fórmico (0,05%)⁽¹²⁶⁾, acetonitrilo⁽⁵³⁾ y acetonitrilo acidificado con ácido acético (0,02%)⁽¹⁵⁾ y con ácido fórmico (0,1%)⁽¹²³⁾ se han empleado como fase orgánica (**Tabla 1.12**). En lo que respecta al análisis cromatográfico de plaguicidas, como fase acuosa se ha utilizado: agua acidificada con ácido fórmico al 0,1%^(20,23,26,128) y al 0,01%⁽²⁵⁾, agua con metanol y ácido fórmico al 0,1%⁽⁶¹⁾ y formiato amónico 10 mM⁽²⁴⁾ (**Tabla 1.13**). Acetonitrilo^(23,128), acetonitrilo acidificado con ácido fórmico al 0,1%^(20,26), metanol⁽²⁵⁾, metanol con ácido fórmico al 0,1%⁽⁶¹⁾ y una mezcla de metanol y agua⁽²⁴⁾, han sido empleados como fase orgánica (**Tabla 1.13**).

En lo que al modo de elución se refiere, aunque la isocrática ha sido aplicada para la separación cromatográfica de nitrofuranos⁽⁵⁴⁾, en la mayoría de las determinaciones de nitrofuranos y plaguicidas se emplea la elución en modo gradiente (**Tablas 1.12 y 1.13**). La optimización de dicha elución en gradiente contribuye a conseguir una adecuada resolución cromatográfica cuando se analizan múltiples compuestos. Por ejemplo, la **Figura 1.9** muestra el cromatograma total de iones (TIC) de un fortificado de puré de albaricoque en el que se refleja la elución de más de 300 plaguicidas con un tiempo total de análisis de 16 minutos.

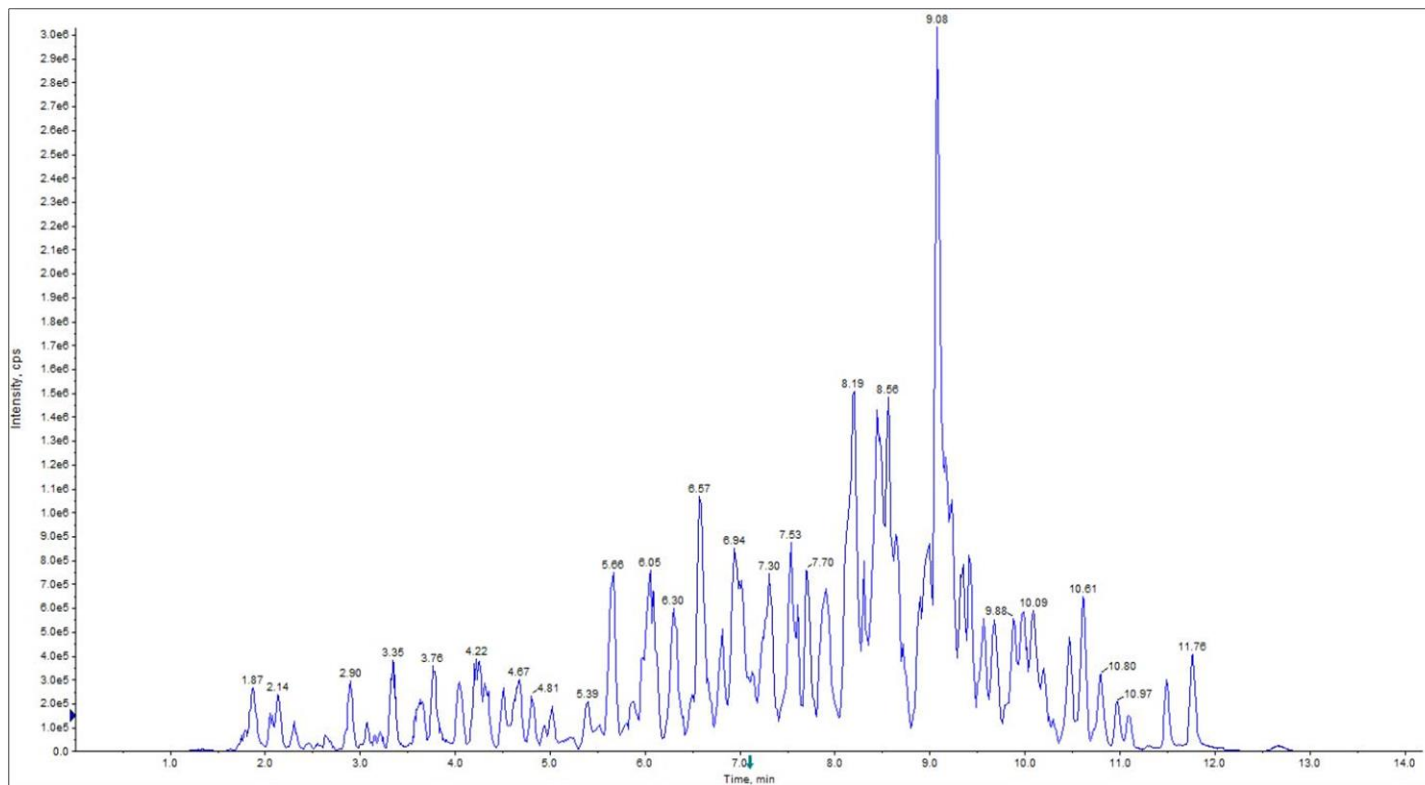


Figura 1.9. *Cromatograma total de iones (TIC) de más de 300 plaguicidas a una concentración cromatográfica de 0,6 µg/kg en puré de albaricoque mediante UHPLC-MS/MS utilizando elución en gradiente (flujo de trabajo 0,35 mL/min, volumen de inyección 5 µL).*

En este caso, formiato amónico 2 mM acidificado con ácido fórmico al 0,1% (fase acuosa) y metanol con ácido fórmico al 0,1% (fase orgánica) han sido utilizados como fase móvil.

Para el análisis de los compuestos objeto de estudio se emplean condiciones de fase reversa, usándose como fase estacionaria columnas de C18 en la mayoría de los casos, con longitudes de 50-250 mm y diámetro interno comprendido en el rango de 2,0-4,6 mm (**Tablas 1.12 y 1.13**). No obstante, en el caso específico de nitrofuranos, es importante matizar que, tal como se abordó en el apartado **6.1.1**, necesitan derivatización química para incrementar su retención y favorecer su separación cromatográfica en columnas de fase reversa. En la mayoría de los trabajos bibliográficos consultados, el análisis de nitrofuranos en muestras de productos del mar se llevaron a cabo con cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) con columnas C18 de tamaños de partícula de 3,0-6,0 μm ^(15,53,124-127).

El tiempo de análisis para la determinación de los cuatro metabolitos oscila entre los 8,25-45 minutos, con flujos de trabajo de 0,2-1,0 mL/min y volúmenes de inyección de 10-20 μL ^(15,53,124-127). Asimismo, la cromatografía de líquidos de ultra alta presión (UHPLC) ha sido aplicada en estudios más recientes, con columnas de tamaño de partícula comprendidas en el rango de 1,7-1,8 μm ^(54,122,123). El tiempo de análisis en este caso varía entre 6-20 minutos, con flujos de trabajo de 0,2-0,6 mL/min y un volumen de inyección de 10 μL ^(54,122,123) (**Tabla 1.12**).

En relación al análisis de plaguicidas en frutas procesadas, LC ha sido aplicada con columnas de fase reversa de tamaño de partícula entre los 4,0-5,0 μm , para el caso de la separación cromatográfica de 24 compuestos (tiempo de análisis 20 minutos, flujo 0,25 mL/min y

volumen de inyección de 40 μL) ⁽¹²⁸⁾; 12 compuestos (columna C18, tiempo de análisis 40 minutos, flujo 0,4 mL/min) ⁽²⁴⁾ y 53 plaguicidas (columna de octilsílice, C8, tiempo de análisis 15 min, flujo 0,6 mL/min y volumen de inyección de 5 μL) ⁽²³⁾. La UHPLC ha sido aplicada también con columnas C18 de tamaño de partícula de 1,7 μm para el análisis de 90 plaguicidas con un tiempo total de análisis de 11 minutos (flujo de fase móvil de 0,35 mL/min) ⁽²⁵⁾ y para 74 plaguicidas con 10 minutos de análisis (flujo de trabajo 0,25 mL/min) ⁽⁶¹⁾. Los volúmenes de inyección en estos análisis cromatográficos fueron de 5 y 10 μL , respectivamente (**Tabla 1.13**).

Actualmente, la miniaturización de los sistemas cromatográficos (micro o nano LC) ^(20,26) ha emergido como una potente herramienta para reducir el volumen de la muestra y el tiempo de análisis, ofreciendo un incremento de la sensibilidad, eficiencia de separación y resolución cromatográfica ⁽⁶⁾. Así, la micro-LC ($\mu\text{LC-MS/MS}$) ha sido aplicada satisfactoriamente al análisis de 99 plaguicidas utilizando una columna C18 (longitud 50 mm, diámetro interno 0,5 mm y 2,7 μm de tamaño de partícula), con un tiempo total de análisis de 14 minutos, un flujo cromatográfico de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 3 μL de volumen de inyección ⁽²⁶⁾. Análogamente, la aplicación de la nano-LC ha sido descrita en bibliografía (**Tabla 1.13**) para la separación de 64 plaguicidas con un tiempo de análisis de 48 minutos ⁽²⁰⁾. En este caso se ha utilizado una columna C18 (longitud 150 mm, diámetro interno 75 μm , y tamaño de partícula de 3 μm con un diámetro de poro de 100 Å) con una pre-columna C18 (20 mm \times 75 μm \times 3 μm , 100 Å), aplicando un flujo de trabajo de 300 nL/min y un volumen de inyección de 1 μL ⁽²⁰⁾.

No obstante, debido a que estos sistemas cromatográficos miniaturizados presentan varios inconvenientes entre los que destacan

la dificultad de acoplamiento al MS, su menor robustez o un limitado rango de fases estacionarias disponibles, su uso no se ha implementado hasta el momento en los laboratorios de rutina ^(6,80).

Es importante hacer hincapié en el hecho de que el efecto matriz que acompaña a las muestras alimentarias es uno de los puntos críticos a tener en cuenta en el análisis cuantitativo mediante LC acoplada a MS (LC-MS). A fin de minimizar dicho efecto matriz, es habitual la aplicación de etapas de limpieza (lo que aumenta la manipulación de la muestra y el tiempo de análisis) o la dilución del extracto para reducir la concentración de los componentes de la matriz (apartado 6.1) ^(6,80).

7.1.2. Técnicas de detección

En un principio, los métodos desarrollados para el análisis de contaminantes en alimentos se basaban en LC acoplada a sistemas de detección de ultravioleta (UV) ⁽¹⁶⁷⁾, fluorescencia (FLD) ⁽⁵³⁾ o diodo array (DAD) ⁽¹²⁷⁾. No obstante, la necesidad de una mayor selectividad y sensibilidad para cumplir con los exigentes requisitos de los límites regulatorios vigentes y el desarrollo tecnológico relativo a instrumentación analítica, impulsaron a su vez el desarrollo de los métodos basados en LC-MS. Particularmente en el caso de los nitrofuranos, para los que la legislación establece tolerancia cero, el objetivo de los métodos analíticos debe ser el de alcanzar el LOD más bajo posible, ya que la presencia del analito a cualquier nivel de concentración por bajo que sea, sería motivo suficiente para señalar una infracción de la ley. Así, de acuerdo con la Decisión 2002/657/CE ⁽⁸⁸⁾ y la Guía SANTE ⁽⁸⁷⁾, actualmente la MS es la primera opción para la inequívoca identificación, confirmación y cuantificación de residuos de contaminantes en alimentos, debido a su fiabilidad, amplio alcance y flexibilidad en términos de analizadores disponibles ^(6,45).

En este contexto, como puede observarse en la **Tabla 1.12**, LC-DAD ha sido comparada con LC-MS/MS para el análisis de nitrofuranos en productos del mar, obteniéndose LODs más bajos con MS: valores en el rango de 0,70-0,91 $\mu\text{g}/\text{kg}$ con DAD frente a LODs de 0,16-0,27 $\mu\text{g}/\text{kg}$ obtenidos con MS ⁽¹²⁷⁾. Análogamente, LC-FLD (LODs de 0,20-0,26 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ha sido evaluada frente a LC-MS/MS (LODs de 0,12-0,21 $\mu\text{g}/\text{kg}$) para la detección de estos compuestos ⁽⁵³⁾.

La MS es, por tanto, una potente herramienta analítica cuya aplicación al análisis de medicamentos veterinarios y plaguicidas en alimentos también ha evolucionado drásticamente a lo largo de los años. De hecho, durante los años 90, los instrumentos de LC-MS estaban basados en analizadores de un solo cuadrupolo (Q) trabajando con técnicas de ionización suaves y utilizando la monitorización de iones seleccionados (SIM). No obstante, tal como aparece reflejado en las **Tablas 1.12** y **1.13**, puede apreciarse que para la detección de nitrofuranos y plaguicidas en alimentos a nivel de trazas, la mayoría de las veces se aplica la LRMS con analizadores de triple cuadrupolo (QqQ) trabajando en modo MS/MS mediante la monitorización de reacciones seleccionadas (SRM) ^(15,54), y la monitorización de reacciones múltiples (MRM) ^(24,25,53,123,124,128), especialmente si hablamos de métodos multiresiduo. Asimismo, la técnica de ionización suave por electrospray (ESI) es la más comúnmente aplicada para la determinación de nitrofuranos y plaguicidas, produciendo iones $[\text{M}+\text{H}]^+$ y aductos $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ y $[\text{M}+\text{Na}]^+$ en modo positivo, e iones $[\text{M}-\text{H}]^-$ en modo negativo (**Tablas 1.12** y **1.13**). Con respecto a la bibliografía consultada, en el caso particular de los nitrofuranos en productos del mar, la aplicación de LC-MS/MS trabajando en modo SRM con ESI positivo ha ofrecido LODs comprendidos en el rango de 0,005-2,0 ng/g ^(15,126). En cuanto al uso de

LC-MS/MS trabajando en modo MRM (ESI positivo), se han obtenido valores de $CC\alpha$ de 0,1-0,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y $CC\beta$ en el intervalo de 0,1-0,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, para el análisis de estos compuestos en muestras de gambas (¹²⁴) y LODs de 0,25-1 ng/g en muestras de marisco y tilapia (¹²³). LC-MS/MS con la interfase de ionización química a presión atmosférica (APCI), ha sido también utilizada para la detección de nitrofuranos en muestras de gambas (modo MRM, LODs de 0,16-0,27 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (¹²⁷) y de bagres, cigalas y gambas procedentes de acuicultura (modo SRM, $\text{LOD} \leq 0,06 \text{ ng}/\text{g}$) (⁵⁴) (**Tabla 1.12**).

Por otro lado, en el análisis de plaguicidas, la aplicación de ESI-MS/MS trabajando en modo SRM ha permitido la obtención de un LOQ de 4,9-26 $\mu\text{g}/\text{L}$ en zumo de naranja (⁶¹). No obstante, la mayor parte de los trabajos consultados para determinación de estos compuestos utilizan LC-MS/MS el modo de trabajo MRM (**Tabla 1.13**). Así, un LOQ comprendido en el rango de 1-20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ha sido obtenido en la detección de 24 plaguicidas en purés, néctares y zumos de frutas (¹²⁸); LOQs de 0,1-5 $\mu\text{g}/\text{L}$ y LODs de 0,03-1,2 $\mu\text{g}/\text{L}$ han resultado del análisis de zumos de frutas (^{24,25}) aplicando esta técnica instrumental (ESI, MRM) (**Tabla 1.13**).

En este contexto, es importante mencionar que desde hace varios años las nuevas generaciones de instrumentos de QqQ ofrecen la opción de trabajar con el modo de trabajo de algoritmo de SRM programado (*scheduled SRM* o sSRM). El sSRM ha sido estudiado en uno de los trabajos bibliográficos consultados, comparándose con el modo de trabajo por SRM clásico en la aplicación de un método multiresiduo para el análisis de 242 plaguicidas por LC-ESI-MS/MS (¹⁶⁸). Los mejores resultados, en términos de reproducibilidad y sensibilidad (mayor relación señal/ruido, S/N), se obtuvieron con sSRM. Este último

permitió obtener un mayor número de puntos por pico cromatográfico, así como la posibilidad de ofrecer LOQs más bajos, aun cuando el número de transiciones de SRM monitorizadas era el doble ⁽¹⁶⁸⁾. Análogamente, en bibliografía hay trabajos que utilizan este modo de trabajo pero descrito por el software del MS utilizado como MRM programado (sMRM), optimizando dos transiciones de SRM para cada compuesto ^(23,26). Así, un límite informado (RL) de 9-45 µg/kg ha sido obtenido en mermelada de frutas (99 compuestos) ⁽²⁶⁾, y un RL de 0,1-10 µg/L en zumos de fruta (53 plaguicidas) ⁽²³⁾.

El cromatograma representado en la **Figura 1.9** es un ejemplo específico de esta aplicación de sMRM, mostrando un TIC de más de 300 plaguicidas (fortificados a 0,6 µg/kg) en puré de fruta, con un método de adquisición de 782 transiciones de SRM (733 en ionización ESI positiva y 49 en negativa).

Por otro lado, aunque no es lo habitual, la HRMS también ha sido aplicada al análisis de nitrofuranos y plaguicidas (**Tablas 1.12 y 1.13**). Conviene recordar que esta técnica ofrece la posibilidad de trabajar en modo de adquisición de barrido completo (*full-scan*) con masa exacta y con una alta sensibilidad combinada con un poder de resolución elevado (> 30000 FWHM) ⁽⁸⁰⁾. Así, un método UHPLC-HRMS fue optimizado para el análisis de nitrofuranos en varias matrices, entre ellas pescado, utilizando un analizador tipo Orbitrap con un poder de resolución de 70000 FWHM ⁽¹²²⁾. Se obtuvieron valores de CC α de 0,01 µg/kg y CC β de 0,02 µg/kg para los cuatro metabolitos en estudio ⁽¹²²⁾. Asimismo, la determinación de 64 plaguicidas se llevó a cabo en mermelada de fruta aplicando la técnica de nano-LC-ESI-HRMS, con un analizador tipo Orbitrap, obteniéndose un LOQ inferior a 0,114 µg/kg ⁽²⁰⁾.

7.2. CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES EN MUESTRAS AMBIENTALES

Durante las últimas décadas, el uso de la MS en estudios medioambientales con el objetivo de investigar la presencia de contaminantes orgánicos se ha visto notablemente incrementado. Esta técnica de detección ha sido asiduamente acoplada con técnicas cromatográficas, tanto GC como LC, debido a su naturaleza complementaria a la hora de hacer frente al análisis de un amplio rango de contaminantes orgánicos de diversa polaridad y volatilidad.

7.2.1. Cromatografía de gases

GC es normalmente la técnica cromatográfica usada para el análisis de mezclas complejas de contaminantes halogenados y PAHs, gracias a la buena resolución ofrecida por las columnas capilares ⁽³¹⁾. Además, el desarrollo de estas columnas capilares permite la determinación específica de congéneres, ya que aporta la resolución cromatográfica necesaria para la mayoría de los compuestos, siendo su acoplamiento a la MS requisito indispensable para hacer frente a todas las dificultades analíticas que entraña este tipo de determinaciones ⁽¹⁶⁹⁾.

Las tres etapas que constituyen el análisis por GC (inyección, separación y detección) deben ser consecuentemente optimizadas. Así, los parámetros instrumentales recogidos en bibliografía para el análisis de POPs y en particular, PAHs, mediante GC-MS en muestras de aguas y sedimentos, se muestran en la **Tabla 1.14**.

La inyección de las muestras para análisis de POPs puede ser llevada a cabo por varios sistemas de inyección automáticos, entre los cuales la inyección sin división (*splitless*) es la más comúnmente utilizada ^(33,38,141,144,147,155,160,161). Asimismo, la técnica de inyección con división o *split* ha sido descrita para el análisis de plaguicidas, PAHs, PBDEs y

PCBs en aguas superficiales ⁽¹⁵⁴⁾. El volumen de inyección (**Tabla 1.14**) varía generalmente entre 1-2 μL ^(38,155,160-161). Adicionalmente, el inyector PTV ha sido utilizado en la determinación de POPs en muestras medioambientales ^(32,146,150,151). Es importante mencionar que en el caso específico de los PBDEs se recomienda el uso de PTV para evitar la degradación de los congéneres termolábiles. De hecho, usando el inyector en modo *split/splitless*, es necesario ajustar correctamente la temperatura de inyección para evitar la pérdida de algunos de estos congéneres ⁽¹⁴⁰⁾.

En el caso de los PAHs, la técnica de inyección aplicada puede ser un factor clave también, dado que algunos (PAHs “pesados”) presentan puntos de ebullición muy elevados. El uso de LVI y de la inyección en columna se considera que es una manera de disminuir la pérdida de dibenzopirenos. De hecho, la combinación de PTV y LVI ha sido aplicada con éxito al análisis de PAHs pesados y ligeros en muestras medioambientales (volumen de inyección 10 μL) ^(150,170). Adicionalmente, la LVI ha sido utilizada en el análisis de PCBs, PAHs, plaguicidas y otros contaminantes en aguas residuales (volumen de inyección 50 μL) ⁽³²⁾ y agua de río ⁽¹⁵¹⁾, así como en la determinación de PAHs en aguas de río y lago (volumen de inyección 50 μL) ⁽¹⁴⁶⁾.

Por otro lado, como consecuencia de la compleja composición de la mayoría de mezclas de POPs, uno de los objetivos de gran parte de los estudios es la mejora y la optimización de la resolución y separación cromatográfica ⁽¹⁷¹⁾. Es un hecho conocido que en GC esta separación viene determinada por la selección de la fase estacionaria, las dimensiones de la columna y la velocidad del gas portador, siendo hidrógeno y helio los gases portadores más empleados ⁽³¹⁾. Las fases estacionarias más utilizadas son columnas apolares o ligeramente

polares (**Tabla 1.14**). Particularmente, las que consisten en 5% fenil-95% metil polisiloxano (por ejemplo, DB-5, DB-5MS o HP-5MS), de baja polaridad, son las que se encuentran con una mayor frecuencia en bibliografía para los compuestos objeto de estudio. Así, columnas HP-5MS han sido utilizadas para la separación de PCBs, OCPs, HCB, PBDEs y otros contaminantes en aguas superficiales, subterráneas y residuales ⁽¹⁵²⁾, así como PCBs, PBBs, plaguicidas y PAHs también en aguas residuales ⁽³²⁾. Asimismo, se han aplicado para el análisis de PAHs en aguas de consumo ^(33,139) y agua de río y de lluvia ⁽¹³⁹⁾, y para la separación cromatográfica de PCBs, PAHs, PBDEs y plaguicidas también en agua de río ⁽¹⁵¹⁾. La columna HP-5MS que aparece en bibliografía presenta una longitud de 30 m, un diámetro interno de 0,25 mm y un espesor de película de 0,25 μm (**Tabla 1.14**). Con las mismas dimensiones, la columna HP-5 ha sido empleada en la separación de PBDEs en muestras de sedimentos ⁽¹⁶¹⁾. Análogamente, la DB-5MS (longitud 30 m, diámetro interno 0,25 mm, espesor 0,25 μm) se ha aplicado para análisis de PAHs en aguas medioambientales ⁽¹⁴⁷⁾ y para *dl*-PCBs ⁽¹⁴³⁾, así como OCPs y HCB ⁽⁶⁵⁾ en sedimentos. También en esta última matriz, la DB-5MS se ha utilizado para PCBs y PCDD/Fs (longitud 60 m, diámetro interno 0,25 mm, espesor 0,25 μm) ^(160,161), PCDD/Fs y *dl*-PCBs (60 m \times 0,32 mm \times 0,25 μm), ⁽⁶⁵⁾, y para la separación de PCDD/Fs, PBDEs, PBBs y HBCD (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm) ⁽³⁸⁾. Asimismo, PCDD/Fs, PCBs y otros contaminantes han sido separados en muestras de sedimentos trabajando con una columna Rtx-5MS (60 m \times 0,25 mm \times 0,1 μm) ⁽¹⁴²⁾. En particular para el análisis de PAHs, se han empleado además otras columnas de baja polaridad como la AB-5MS (30 m \times 0,32 mm \times 0,25 μm) ⁽¹⁵³⁾ y una Rxi-5ms (30 m \times 0,25

mm × 0,25 μm) ⁽¹⁴⁶⁾ en aguas medioambientales, así como una columna BR-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) en agua de mar ⁽¹⁵⁵⁾.

Por otro lado, una columna de polaridad media, VF-17MS (20 m × 0,15 mm × 0,05 μm), con una composición de 50% fenil/50% dimetilpolisiloxano, ha sido aplicada en la separación cromatográfica de 24 PAHs en aguas residuales ⁽¹⁵⁰⁾.

Adicionalmente, se han utilizado columnas de polaridad media, DB-17HT (30 m × 0,32 mm × 0,15 μm), para el análisis de OCPs, PCBs y PAHs en agua de río ⁽¹⁴⁴⁾ o una DB-17 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) para PCDD/Fs en sedimentos ⁽¹⁴³⁾. No obstante, en la **Tabla 1.14**, puede apreciarse que también se han empleado columnas más polares de fase de polisilfenileno. Este es el caso de la Rtx-Dioxin2 (40 m × 0,18 mm × 0,18 μm) aplicada en la determinación de OCPs en agua de río ⁽¹⁴¹⁾, o la TR-DIOXIN-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,1 μm) para separar plaguicidas, PAHs, BDEs, y PCBs en aguas superficiales ⁽¹⁵⁴⁾.

En este contexto, es preciso mencionar que columnas más cortas (5-15 m) pueden utilizarse puntualmente para determinadas aplicaciones (por ejemplo la determinación de compuestos termolábiles tales como BDE-209), con la ventaja de análisis más rápidos sin pérdida de resolución ⁽³¹⁾. De hecho, una columna RTX-1614 (5% difenil, 95% dimetil polisiloxano, baja polaridad) de 15 m de longitud (0,25 mm × 0,25 μm) ha sido empleada específicamente para la separación cromatográfica del PBDE 209 en el análisis de muestras de sedimentos ⁽³⁸⁾ (**Tabla 1.14**). Además, la separación de mezclas de PBDEs puede realizarse en columnas cortas capaces de separar eficientemente nona- y deca-BDEs, mientras que columnas más largas son adecuadas para la separación de BDEs bromados inferiores (con un menor número de átomos de bromo) ⁽¹⁴⁰⁾.

Tabla 1.14. Resumen bibliográfico de las diferentes técnicas instrumentales aplicadas para el análisis de POPs en muestras ambientales.

ANALITOS (NÚMERO)	MATRIZ	TÉCNICA INSTRUMENTAL	FASE ESTACIONARIA	MODO DE INYECCIÓN (VOLUMEN)	LOD/LOQ	REF.
PCBs (7), OCPs, HCB, PBDEs (11), otros contaminantes	Aguas superficiales, subterráneas, residuales	GC-EI-HRTOF-MS (RP~7000)	HP-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm)	N.D.	N.D.	(152)
PCBs (18), OCPs (28), PAHs (16)	Agua de río	GC-EI-HRMS (SIM), RP > 8000	PCBs, PAHs: Rtx-CL Pesticides ² (30 m × 0,25 mm × 0,2 μm) OCPs: Rtx-Dioxin ² (40 m × 0,18 mm × 0,18 μm)	Splitless (0,5 μL)	N.D.	(141)
PAHs (16)	Aguas medioambientales	GC-EI-MS (SIM)	DB-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm)	Splitless (1 μL)	LOD: 2,0-8,5 ng/L	(147)
PAHs (24)	Aguas residuales	GC-EI-MS/MS (SRM)	VF-17MS (20 m × 0,15 mm × 0,05 μm)	LVI (10 μL)	LOD: 0,002-0,010 μg/L	(150)
PAHs (16)	Agua de consumo	GC-EI-MS (SIM)	HP-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm)	Splitless (1 μL)	N.D.	(33)
OCPs (16), PCBs (3), PAHs y otros contaminantes	Agua de río	a) GC × GC-EI-HRTOF-MS b) GC-EI-HRMS (SIM)	a) DB-5 (10 m × 0,18 mm × 0,18 μm); ² D: BPX-50 (1 m × 0,10 mm × 0,10 μm); b) DB-17HT (30 m × 0,32 mm × 0,15 μm)	a) Splitless b) Splitless (1,5 μL)	a) LOD: 10-44 pg/L	(144)

ANALITOS (NÚMERO)	MATRIZ	TÉCNICA INSTRUMENTAL	FASE ESTACIONARIA	MODO DE INYECCIÓN (VOLUMEN)	LOD/LOQ	REF.
PCBs (16), PBBs (4), plaguicidas (16), PAHs (16), y otros contaminantes	Aguas residuales	GC-EI-MS (<i>full-scan</i> y SIM)	HP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm)	LVI, PTV (50 μL)	LOD: 1-322 ng/L	(32)
PAHS (8)	Aguas medioambientales	GC-EI-MS (SIM)	Rxi-5ms (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm)	a) PTV (5 μL) b) LVI (50 μL)	a) LOD: 9,0-35,9 ng/L b) LOD: 0,8-8,2 ng/L	(146)
PAHs (16)	Aguas medioambientales	GC-EI-MS (MRM)	AB-5MS (30 m × 0,32 mm × 0,25 μm)	N.D.	LOD: 0,10-0,73 ng/L	(153)
PCBs (10), PAHs (12), PBDEs (6), plaguicidas (49)	Agua de río	GC-EI-MS/MS (SRM)	HP-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm)	PTV, TDU	LOQ: 0,14-10 ng/L	(151)
PAHs (16)	Agua de mar	GC-EI-MS (MRM)	BR-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm)	<i>Splitless</i> (1 μL)	LOD: 0,21-0,82 ng/L	(155)
Plaguicidas (14), PAHs (16), BDEs (6), y PCBs (26)	Aguas superficiales	GC-EI-HRMS (sector magnético, MID), RP: 10000	TR-DIOXIN-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,1 μm)	<i>Split</i>	LOQ: 0,1-50 ng/L	(154)
PAHs (10)	Agua de río, del grifo y de lluvia	GC-EI-MS (SIM)	HP-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm)	N.D.	LOD: 0,5-8,7 ng/L	(139)
PCDD/Fs (17); PCBs (18), PBDEs (16)	Sedimentos	GC-EI-HRMS (sector magnético, SIM), RP ≥ 10000	PBDEs: HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm);	<i>Splitless</i> (1 μL)	N.D.	(161)

ANALITOS (NÚMERO)	MATRIZ	TÉCNICA INSTRUMENTAL	FASE ESTACIONARIA	MODO DE INYECCIÓN (VOLUMEN)	LOD/LOQ	REF.
			PCBs + PCDD/Fs: DB-5MS (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm)			
OCPs (21), HCB	Sedimentos	GC-EI-HRMS (sector magnético, SIM), RP > 10000	ENV-8MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	N.D.	N.D.	(162)
PCDD/Fs (17), dl-PCBs	Sedimentos	GC-HRMS (RP: 10000)	DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); PCDD/Fs: DB-17 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	N.D.	N.D.	(143)
PCDD/Fs, dl- PCBs, OCPs, HCB	Sedimentos	GC-HRMS (SIM)	(a) PCDD/Fs: DB-5MS (60 m x 0,32 mm x 0,25 µm); OCPs y HCB: DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (b) dl-PCBs: DB-5MS (60 m x 0,32 mm x 0,25 µm)	N.D.	LOD: 0,01- 500 ng/kg	(65)
PCDD/Fs, PCBs, otros contaminantes	Sedimentos	GC-EI-HRMS	Rtx-5MS (60 m x 0,25 mm x 0,1 µm)	N.D.	N.D.	(142)
a) PCDD/Fs (17) b) dl-PCBs (12)	Sedimentos	GC-HRMS (sector magnético), RP: 10000	DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	N.D.	a) LOD: 0,0009 pg/g de peso seco	(164)

ANALITOS (NÚMERO)	MATRIZ	TÉCNICA INSTRUMENTAL	FASE ESTACIONARIA	MODO DE INYECCIÓN (VOLUMEN)	LOD/LOQ	REF.
					b) LOD: 0,036 pg/g de peso seco	
PCDD/Fs (17), PCBs (18)	Sedimentos	GC-EI-HRMS (sector magnético, SIM), RP: 10000	DB-5MS (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	Splitless (1 µL)	N.D.	(160)
PCDD/Fs (17), PCBs (7), PBDEs (8), PBBs (3), HBCD (3), OCPs (31)	Sedimentos	GC-EI- HRMS (sector magnético, SIM), RP: 10000	HT8PCB (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (PCBs, OCPs); DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (PCDD/Fs, PBDEs, PBBs, HBCD) RTX-1614 (15 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (PBDE 209)	Splitless (2 µL)	LOD: 0,049-129,2 µg/kg peso en seco	(38)

Abreviaturas. *dl*-PCBs: bifenilos policlorados similares a las dioxinas; EI: ionización electrónica; GC: cromatografía de gases; GC×GC: cromatografía de gases bidimensional; HBCD: hexabromociclododecano; HCB: hexaclorobenceno; HRMS: espectrometría de masas de alta resolución; HRTOF: tiempo de vuelo de alta resolución; LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación; LVI: inyección de gran volumen; MID: detección de ion múltiple; MRM/SRM: monitorización de reacciones múltiples; MS: espectrometría de masas; N.D.: no disponible; OCPs: plaguicidas organoclorados; PAHs: hidrocarburos aromáticos policíclicos; PBBs: bifenilos polibromados; PBDEs: difeniléteres bromados; PCBs: bifenilos policlorados; PCDD/Fs: dioxinas y furanos; PTV: vaporizador de temperatura programable; RP: poder de resolución; SIM: monitorización de los iones seleccionados; TDU: unidad de desorción térmica; TOF: tiempo de vuelo.

No obstante, la co-elución de los compuestos de interés e interferentes es un problema relevante en la separación por GC ^(161, 171). En el caso particular de los PAHs, la obtención de una resolución adecuada puede ser un punto crítico dependiendo del grupo específico de compuestos que se analicen. Esto adquiere especial relevancia en el caso de aquellos PAHs que no pueden resolverse por MS, como el caso de los isómeros. De hecho, si los compuestos que solapan presentan iones isobáricos, una cuantificación exacta resulta considerablemente difícil o imposible ⁽⁶⁸⁾. Los tres isómeros BbFA, benzo[*j*]fluoranteno (BjFA) y BkFA o el par IP y dibenzo[*a,h*]antraceno (DBahA), son algunos de los grupos de PAHs que presentan este tipo de problema de resolución crítico. Sin embargo, la resolución de este conflicto de co-elución ha sido descrita mediante el uso de columnas de 50% fenil-50% metilpolisiloxano de polaridad media ⁽¹⁷²⁾. De hecho, un estudio comparativo llevado a cabo mediante la evaluación de varias columnas diferentes para la separación cromatográfica de 16 PAHs, mostró que la columna DB-17MS (20 m × 0,18 mm × 0,14 μm) ofrecía los mejores resultados para los pares críticos con un tiempo de análisis total de 45 minutos ⁽¹⁷²⁾.

Las típicas columnas de fenilo al 5% también pueden exhibir múltiples co-eluciones para PCBs y PCDD/Fs ⁽¹⁷³⁾. No obstante, es importante ser consciente de que una única columna capaz de separar todos los congéneres de PCBs, PBDEs o PCDD/Fs no puede encontrarse en el mercado ⁽³¹⁾. De forma alternativa, a fin de identificar compuestos que tienden a co-eluir, se puede recurrir al uso de fases más polares. Particularmente, en el análisis de PCDD/Fs y *dl*-PCBs se han desarrollado algunas columnas que se caracterizan por una fase estacionaria más polar que hace posible la separación de pares críticos como son 2,3,4,6,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (2,3,4,6,7,8-TCDD) y

2,3,4,7,8-pentaclorodibenzofurano (pentaCDF) o 2,3,4,6,7,8-TCDD y 2,3,4,6,7,8-hexaCDF ⁽³¹⁾. Algunas de estas columnas son la DB-Dioxin (44% metil-28% fenil-20% cianopropilpolisiloxano), BPX-DXN o Rtx-Dioxin2 (fase de polisilfenileno) ⁽¹⁷³⁾. No obstante, para conseguir llevar a cabo el desafío de lograr la total separación de los 17 PCDD/Fs más tóxicos (que es lo que exige la regulación actual), en bibliografía se ha descrito la combinación de fases estacionarias apolares y polares (por ejemplo, DB-5 y DB-225; DB-5MS y SP-2331 (90% biscianopropil-10% fenil cianopropilsiloxano)) ⁽¹⁷¹⁾.

Por último, la cromatografía de gases bidimensional (GC × GC) también ha sido satisfactoriamente aplicada para el análisis de OCPs, PCBs, PAHs y otros contaminantes en agua de río, utilizando una primera columna apolar DB-5 (10 m × 0,18 mm × 0,18 μm) y una segunda más polar DB-17HT (30 m × 0,32 mm × 0,15 μm) ⁽¹⁴⁴⁾.

7.2.2. Técnicas de detección

El uso de la MS en el análisis de mezclas complejas de PAHs y POPs (coexistiendo multitud de congéneres e isómeros) en las matrices medioambientales resulta indispensable (frente a otros sistemas de detección clásicos, tales como FLD o detector de captura de electrones, ECD) para la cuantificación exacta de aquellos compuestos que no pueden ser resueltos cromatográficamente. Igual que ha sucedido en el ámbito de la seguridad alimentaria, a lo largo de los años se ha observado una clara tendencia en las técnicas instrumentales aplicadas en análisis medioambiental, que han ido pasando de la GC-LRMS con un analizador de masas de un solo Q, a la MS/MS y, más posteriormente, a la HRMS, con analizadores de sector magnético, tiempo de vuelo (TOF) y Orbitrap.

Espectrometría de masas de baja resolución (LRMS)

La mayoría de los PAHs son analizados utilizando GC-LRMS con analizadores de simple *Q* y trabajando en el modo SIM (**Tabla 1.14**). Esto se debe principalmente a que durante la ionización se obtienen iones muy estables y difíciles de fragmentar por MS/MS (generándose iones producto sólo unas pocas unidades de relación masa-carga, *m/z*, menos que el ion precursor) (68). Así, 16 de estos compuestos han sido determinados en aguas medioambientales mediante GC-MS trabajando en modo SIM (obteniéndose LODs de 2,0-8,5 ng/L) (147), y en agua de consumo (33). 8 PAHs han sido también analizados mediante GC-MS (modo SIM) en aguas medioambientales con LODs en el rango de 0,8-35,9 ng/L (146), así como 10 PAHs en agua de río, de grifo y de lluvia (LODs: 0,5-8,7 ng/L) (139). Asimismo, una mezcla de 16 PAHs, 16 PCBs, 4 PBBs y 16 plaguicidas ha sido analizada mediante esta misma técnica en aguas residuales, observándose LODs comprendidos en el intervalo de 1-322 ng/L para todos los analitos (32).

Por otro lado, la técnica de GC-MS/MS también ha sido aplicada al análisis de PAHs: trabajando en modo SRM (2 transiciones SRM para cada uno de los 24 compuestos) en aguas residuales (LODs de 0,002-0,010 µg/L) (150); y trabajando en MRM para 16 PAHs en agua de mar (LODs: 0,21-0,82 ng/L) (155). Asimismo, se han obtenido LOQs en el rango de 0,14-10 ng/L en el análisis de 10 PCBs, 12 PAHs, 6 PBDEs y 49 plaguicidas en agua de río (151) mediante GC-MS/MS (SRM).

En todos los trabajos bibliográficos de LRMS arriba descritos (**Tabla 1.14**), el modo de ionización aplicado ha sido la ionización electrónica o impacto electrónico (EI).

En el caso de otros POPs, como los PCDD/Fs y *dl*-PCBs, aunque HRMS es la técnica de referencia para su análisis (cómo se verá en el siguiente

apartado), también se han llevado a cabo algunos trabajos utilizando LRMS (^{174,175}). No obstante, es difícil encontrar estudios en los que se aplique LRMS para muestras medioambientales, ya que la mayoría están focalizados en muestras de piensos y alimentos. Por ejemplo, se ha realizado un estudio comparativo entre GC-QqQ (MS/MS) y GC-HRMS (sector magnético) para el análisis de PCDD/Fs y *dl*-PCBs en muestras medioambientales (lodos de depuradora) y alimentarias (¹⁷⁴). Y aunque la sensibilidad obtenida mediante LRMS fue menor que con HRMS, ésta fue descrita como suficientemente elevada para detectar las concentraciones habituales de estos compuestos en las matrices analizadas. En general, con GC-MS/MS se obtuvieron LODs de 0,07-0,75 pg/ μ L para PCDD/Fs y 0,05-0,63 pg/ μ L para *dl*-PCBs (¹⁷⁴). Por otro lado, el uso de GC-QqQ-MS (en lugar de HRMS) utilizando ionización a presión atmosférica (API) como fuente de ionización, ha sido descrito para el análisis de 17 PCDD/Fs en sedimentos y pescado (¹⁷⁵). La ventaja de API frente a la habitual EI es que genera un mayor ion molecular (técnica de ionización suave), lo que supone un incremento de la sensibilidad usando MRM, comparable a la que ofrece el uso de GC-HRMS. Los límites de detección del método (MDL) fueron de 0,15-1,4 pg/g utilizando GC-MS/MS (API) frente a los 0,68-4,9 pg/g con GC-HRMS (¹⁷⁵).

Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)

En la actualidad, la GC-HRMS basada en instrumentos de sector magnético es la técnica instrumental de referencia para el análisis de algunos POPs, como es el caso de los PCDD/Fs y *dl*-PCBs (^{145,171}). De hecho, el análisis de estos compuestos es el principal y más importante campo de aplicación de la HRMS, ya que es capaz de aportar la sensibilidad y resolución exigidas en este campo de estudio. Como

puede apreciarse en la **Tabla 1.14**, en términos generales, los POPs son analizados por GC-HRMS con analizadores de sector magnético a una resolución igual o superior a 10000 (10% de definición de valle) usando EI y trabajando en modo SIM para los dos iones más abundantes del clúster (incluyendo los iones marcados isotópicamente). Esta resolución de 10000 es necesaria en particular para obtener la resolución de masas espectral necesaria para separar los PCDD/Fs y *dl*-PCBs de otros contaminantes orgánicos halogenados que suelen ser interferentes habituales ⁽¹⁷⁵⁾. Así, en muestras de sedimentos, la HRMS ha sido aplicada en diversos estudios al análisis de 17 PCDD/Fs, 18 PCBs y 16 PBDEs ⁽¹⁶¹⁾, OCPs y HCB ^(65,162), 17 PCDD/Fs y *dl*-PCBs ^(65,143), con LODs de 0,01-500 ng/kg ⁽⁶⁵⁾. Esta técnica ha sido también empleada en la determinación de 18 PCBs, 28 OCPs y 16 PAHs en muestras de agua de río (resolución superior a 8000) obteniéndose resultados adecuados ⁽¹⁴¹⁾. Adicionalmente, GC-HRMS basada en un instrumento de sector magnético (poder de resolución 10000) trabajando en el modo de adquisición de detección de ion múltiple (MID), se ha aplicado para al análisis de 14 plaguicidas, 16 PAHs, 6 BDEs y 26 PCBs en aguas superficiales, obteniéndose valores de LOQ en el rango de 0,1-50 ng/L ⁽¹⁵⁴⁾. Asimismo, espectrómetros de masas de sector magnético de doble enfoque (resolución 10000) se han empleado para analizar POPs en muestras de sedimentos, obteniéndose LODs en el rango de 0,0009-0,036 pg/g ⁽¹⁶⁴⁾ y 0,049-129,2 µg/kg de peso seco ⁽³⁸⁾ en el análisis de 17 PCDD/Fs y 12 *dl*-PCBs ⁽¹⁶⁴⁾ y de una mezcla de 17 PCDD/Fs, 7 PCBs, 8 PBDEs, 3 PBBs, 3 HBCD y 31 OCPs ⁽³⁸⁾, respectivamente. Aunque menos frecuente (véase **Tabla 1.14**), también se ha aplicado la GC acoplada a MS con analizador de TOF de alta resolución (GC-HRTOF-MS), trabajando con una resolución aproximadamente de 7000

y en modo de ionización EI, al análisis de 7 PCBs, OCPs, HCB y 11 PBDEs en aguas superficiales, subterráneas y residuales ⁽¹⁵²⁾. En este trabajo además, se ha llevado a cabo un análisis retrospectivo para evaluar la presencia de PBDEs y otros compuestos examinando los datos de MS del barrido completo o *full-scan* ⁽¹⁵²⁾. Asimismo, se ha aplicado el analizador de HRTOF-MS acoplado a GC × GC para el análisis de 16 OCPs, 3 PCBs, PAHs y otros contaminantes orgánicos en muestras de agua de río, obteniéndose valores de LODs comprendidos entre 10-44 pg/L ⁽¹⁴⁴⁾.

Finalmente, en bibliografía también puede encontrarse la aplicación de GC acoplada a un MS híbrido de trampa de iones de cuadrupolo lineal (QLT)-Orbitrap (capaz de alcanzar una resolución > 100000 a m/z 400) para la determinación de PCDD/Fs en muestras medioambientales, obteniéndose un LOD empírico de 10 fg ($S/N = 5$) ⁽¹⁷⁶⁾.

No obstante, pese al uso de HRMS, pueden seguir apareciendo problemas de interferentes en el análisis de mezclas complejas de POPs, como es el caso de la interferencia potencial de compuestos clorados (por ejemplo, PCBs) cuando se analizan PBDEs utilizando EI. Por ejemplo, las masas nominales correspondientes a los iones monitorizados para di-BDEs y penta-CBs son idénticas (m/z 326), por lo que sería necesario un poder de resolución extremadamente alto (24000) para separarlos, en cuyo caso, se observaría una notable disminución de la sensibilidad (pese a que los HRMS modernos de doble enfoque permiten alcanzar valores de resolución mayores) ⁽¹⁴⁰⁾.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ *Definitions for the Purposes of the Codex Alimentarius*. Disponible en <http://www.fao.org/3/y2200e/y2200e07.htm> (último acceso marzo 2020)

² <http://www.fao.org/home/es/> (último acceso marzo 2020)

³ EEA, 2015. *The European Environment – state and outlook 2015 – synthesis report*, European Environment Agency, Copenhagen.

⁴ Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *The State of World Fisheries and Aquaculture. Contributing to food security and nutrition for all*. Rome: FAO; 2016. p. 200. ISBN 978-92-5-109185-2.

⁵ A. A. M. Stolker, U. A. T. Brinkman, *Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs in growth-promoting agents in food-producing animals – a review*, *Journal of Chromatography A*, 1067 (2005) 15-53.

⁶ R. Romero-González, *Food safety: How analytical chemists ensure it*, *Analytical Methods*, 7 (2015) 7193-7201.

⁷ <http://www.fao.org/aquaculture/es/> (último acceso diciembre 2019)

⁸ F. Cañada-Cañada, A. M. de la Peña, A. Espinosa-Mansilla, *Analysis of antibiotics in fish samples – Review*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395 (2009) 987-1008.

⁹ V. F. Samanidou, E. N. Evaggelopoulou, *Review: Analytical strategies to determine antibiotic residues in fish*, *Journal of Separation Science*, 30 (2007) 2549-2569.

¹⁰ R. C. Okocha, I. O. Olatoye, O. B. Adedeji, *Review: Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture*, *Public Health Reviews*, 39 (2018) 21-43.

¹¹ T. Delatour, L. Racault, T. Bessarie, A. Desmarchelier, *Screening of veterinary drug residues in food by LC-MS/MS. Background and challenges*, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35 (2018) 632-645.

¹² M. D. Marazuela, *Chapter 18. Determination of veterinary drug residues in foods by liquid chromatography-mass spectrometry: Basic and cutting-edge applications*, 539-570, In: *Liquid Chromatography. Applications*, 2nd Edition, Elsevier Inc., Editors S. Fanali, P. R. Haddad, C. Poole, M. L. Riekkola (2017).

¹³ C. Douny, J. Widart, E. De Pauw, F. Silvestre, P. Kestemont, H. T. Tu, N. T. Phuong, G. Maghuin-Rogister, M. L. Scippo, *Development of an analytical method to detect metabolites of nitrofurans. Application to the study of furazolidone elimination in Vietnamese black tiger shrimp (Penaeus monodon)*, *Aquaculture*, 376-379 (2013) 54-58.

¹⁴ Gale F., Buzby JC. *Imports from China and food safety issues DIANE*. 2009. <http://ageconsearch.umn.edu/bitstream/58620/2/EIB52.pdf>. (último acceso diciembre 2019)

¹⁵ V. Palaniyappan, A. K. Nagalingam, H. P. Ranganathan, K. B. Kandhikuppam, H. P. Kothandam, S. Vasu, *Microwave-assisted derivatization and LC-MS/MS determination of nitrofurans metabolites in farm-raised prawns (Penaeus monodon)*, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30 (2013) 1739-1744.

- ¹⁶ *Handbook of fruit and fruit processing*, Second Edition, Edited by N. K. Sinha, J. S. Sidhu, J. Barta, J. S. B. Wu, M. P. Cano, Wiley-Blackwell, A John Wiley & Sons, Ltd., Publication, 2012.
- ¹⁷ FAO. (1995). *FAO Agricultural Services Bulletin No 119. Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/v5030E/V5030E00.htm#Contents>. (último acceso marzo 2020).
- ¹⁸ G. Kaushik, S. Satya, S. N. Naik, *Food processing a tool to pesticide residue dissipation – A review*, *Food Research International*, 42 (2009) 26-40.
- ¹⁹ N. Sumonsiri, S. A. Barringer, *Chapter 16: Fruits and vegetables-processing technologies and applications*, pp. 363-381. In: *Food Processing: Principles and Applications: Second Edition*, John Wiley & Sons (Eds.) (2014).
- ²⁰ D. Moreno-González, P. Pérez-Ortega, B. Gilbert-López, A. Molina-Díaz, J. F. García-Reyes, A. R. Fernández-Alba, *Evaluation of nanoflow liquid chromatography high resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in food*, *Journal of Chromatography A*, 1512 (2017) 78-87.
- ²¹ R. Romero-González, A. G. Frenich, J. L. M. Vidal, 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.
- ²² EFSA, European Food Safety Authority. (2018). *The 2016 European Union report on pesticides residues in food*. *EFSA Journal*, 16 (7), 5348. Disponible en: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2018.5348> (último acceso marzo 2020)
- ²³ C. Ferrer, M. J. Martínez-Bueno, A. Lozano, A. R. Fernández-Alba, *Pesticide residue analysis of fruit juices by LC-MS/MS direct injection. One year pilot survey*, *Talanta*, 83 (2011) 1552-1561.
- ²⁴ Y. Picó, C. Kozmutza, *Evaluation of pesticide residue in grape juices and the effect of natural antioxidants on their degradation rate*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389 (2007) 1805-1814.
- ²⁵ R. Romero-González, A. G. Frenich, J. L. M. Vidal, *Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*, *Talanta*, 76 (2008) 211-225.
- ²⁶ B. Reichert, I. R. Pizzutti, I. H. Costabeber, A. Uclés, S. Herrera, A. R. Fernández-Alba, *Validation and application of micro flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of pesticide residues in fruit jams*, *Talanta*, 134 (2015) 415-424.
- ²⁷ *BfR data compilation on processing factors*. BfR Communication No. 034/2019, 3 September 2019. Federal Institute for Risk Assessment. Documento disponible en: <https://www.bfr.bund.de/cm/349/bfr-data-collection-on-processing-factors.pdf> (último acceso marzo 2020).
- ²⁸ M. R. Moore, W. Vetter, C. Gaus, G. R. Shaw, J. F. Müller, *Trace organic compounds in the marine environment*, *Marine Pollution Bulletin*, 45 (2002) 62-68.
- ²⁹ A. G. Smith, S. D. Gangolli, *Organochlorine chemicals in seafood: occurrence and health concerns*, *Food and Chemical Toxicology*, 40 (2002) 767-779.

- ³⁰ A. Mechlińska, L. Wolska, J. Namieśnik, *Isotope-labeled substances in analysis of persistent organic pollutants in environmental samples*, Trends in Analytical Chemistry, 29 (2010) 820-831
- ³¹ S. P. J. van Leeuwen, J. de Boer, *Advances in the gas chromatography determination of persistent organic pollutants in the aquatic environment*, Journal of Chromatography A, 1186 (2008) 161-182.
- ³² E. Bizkarguenaga, O. Ros, A. Iparraguirre, P. Navarro, A. Vallejo, A. Usobiaga, O. Zuloaga, *Solid-phase extraction combined with large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry for the multiresidue determination of priority and emerging organic pollutants in wastewater*, Journal of Chromatography A, 1247 (2012) 104-117.
- ³³ A. Kouzayha, M. A. Iskandarani, S. Mokh, A. R. Rabaa, H. Budzinski, F. Jaber, *Optimization of a solid-phase extraction method using centrifugation for the determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in water*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 (2011) 7592-7600.
- ³⁴ J. Robles-Molina, B. Gilbert-López, J. F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, *Monitoring of selected priority and emerging contaminants in the Guadalquivir River and other related surface waters in the province of Jaén, South East Spain*, Science of the Total Environment, 479-480 (2014) 247-257.
- ³⁵ Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas, Boletín Oficial del Estado (BOE), Ministerio de la Presidencia, Gobierno de España, pp. 50639.
- ³⁶ Reglamento (CE) N° 850/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 sobre contaminantes orgánicos persistentes y por el que se modifica la Directiva 79/117/CE, Diario Oficial de la Unión Europea, L158/7.
- ³⁷ <http://chm.pops.int/TheConvention/Overview/tabid/3351/Default.aspx> (último acceso marzo 2020).
- ³⁸ Y. Liber, B. Mourier, P. Marchand, E. Bichon, I. Perrodin, J. P. Bedell, *Past and recent state of sediment contamination by persistent organic pollutants (POPs) in the Rhône River: Overview of ecotoxicological implications*, Science of the Total Environment, 646 (2019) 1037-1046.
- ³⁹ A. Oren, Z. Aizenshtat, B. Chefetz, *Persistent organic pollutants and sedimentary organic matter properties: A case study in the Kishon River, Israel*, Environmental Pollution, 141 (2006) 265-274.
- ⁴⁰ J. Liebens, C. J. Mohrherr, N. K. Karouna-Renier, R. A. Snyder, K. R. Rao, *Associations between dioxins/furans and dioxin-like PCBs in estuarine sediment and blue crab*, Water, Air, and Soil Pollution, 222 (2011) 403-419.
- ⁴¹ A. G. Frenich, P. Plaza-Bolaños, M. M. Aguilera-Luiz, J. L. Martínez-Vidal, *Chapter 1: Recent advances in the analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents by chromatography techniques*, In: Chromatography Types, Techniques and Methods, Nova Science Publishers, Inc. Editor Toma J. Quintin, ISBN 978-1-60876-316-0. (2009).
- ⁴² J. Barbosa, M.L. Ferreira, F. Ramos, M. I. N. da Silveira, *Determination of the furaltadone metabolite 5-methylmorpholino-3-amino-2-oxazolidinone (AMOZ) using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry during the nitrofurantoin crisis in Portugal*, Accreditation and Quality Assurance, 12 (2007) 543-551.

⁴³ A. Gentili, D. Perret, S. Marchese, *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products*, Trends in Analytical Chemistry, 24 (2005) 704-733.

⁴⁴ M. Vass, K. Hruska, M. Franek, *Nitrofurán antibiotics: a review on the application, prohibition and residual analysis*, Veterinarni Medicina, 53 (2008) 469-500.

⁴⁵ K. Mastovska, *Chapter 12: Multiresidue analysis of antibiotics in food of animal origin using liquid-chromatography-mass spectrometry*, 267-308. In: Mass Spectrometry in food safety. Methods and protocols, Humana Press, Editor Jerry Zweigenbaum, (2011).

⁴⁶ *Reglamento (CEE) N° 2901/93 del Consejo de 18 de octubre de 1993 que modifica los Anexos I, II, III y IV del Reglamento (CEE) n° 2377/90 por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal*, Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L264 (1993) 1.

⁴⁷ *Reglamento (CE) N° 1442/95 de la Comisión de 26 de junio de 1995 por el que se modifican los Anexos I, II, III y IV del Reglamento (CEE) n° 2377/90 del Consejo por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal*, Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L143 (1995) 26.

⁴⁸ A. Di Corcia, M. Nazzari, *Review: Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products*, Journal of Chromatography A, 974 (2005) 53-89.

⁴⁹ International Agency of Research on Cancer (IARC). NITROFURAL (NITROFUZAZONE). Información disponible en: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v31je07.htm> (último acceso marzo 2020).

⁵⁰ International Agency of Research on Cancer (IARC). FUZAZOLIDONE. Información disponible en: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v31je06.htm> (último acceso marzo 2020).

⁵¹ International Agency of Research on Cancer (IARC). NITROFUZANTOIN. Información disponible en: <http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/pim377.htm> (último acceso marzo 2020).

⁵² International Agency of Research on Cancer (IARC). 5-(MORFOLINOMETIL)-3-((5-NITROFUZUFURILIDENO)-AMINO)-2-OXAZOLIDINONE. Información disponible en: [http://www.inchem.org/documents/iarc/vol07/5-\(morpholinomethyl\)-3-\[\(5.html](http://www.inchem.org/documents/iarc/vol07/5-(morpholinomethyl)-3-[(5.html) (último acceso marzo 2020).

⁵³ N. N. Du, M. M. Chen, L. Q. Sheng, S. S- Chen, H. J. Xu, Z. D. Liu, C. F. Song, R. Quiao, *Determination of nitrofurán metabolites in shrimp by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a new derivatization reagent*, Journal of Chromatography A, 1327 (2014) 90-96.

⁵⁴ B. T. Veach, C. A. Baker, J. H. Kibbey, A. Fong, B. J. Boradaway, C. P. Drake, *Quantitation of chloramphenicol and nitrofurán metabolites in aquaculture products*

using microwave-assisted derivatization, automated SPE and LC-MS/MS, *Journal of AOAC International*, 98 (2015) 588-594.

⁵⁵ S. Effkemann, F. Feldhusen, *Triple-quadrupole LC-MS-MS for quantitative determination of nitrofuran metabolites in complex food matrixes*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378 (2004) 842-844.

⁵⁶ https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides_en (último acceso marzo 2020).

⁵⁷ B. Kmellár, L. Abrankó, P. Fodor, S. J. Lehotay, *Routine approach to qualitatively screening 300 pesticides and quantification of those frequently detected in fruit and vegetables using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)*, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 27 (2010) 1415-1430.

⁵⁸ T. Kovalczuk, M. Jech, J. Poustka, J. Hajšlová, *Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A novel challenge in multiresidue pesticide analysis in food*, *Analytica Chimica Acta*, 577 (2006) 8-17.

⁵⁹ D. A. Lambropoulou, T. A. Albanis, *Headspace solid phase microextraction applied to the analysis of organophosphorus insecticides in strawberry and cherry juices*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002) 3359-3365.

⁶⁰ J. A. Ramírez, M. Lacasaña, *Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición*, *Archivos de Prevención de riesgos laborales*, 4 (2001) 67-75.

⁶¹ T. M. Rizzetti, M. Kemmerich, M. L. Martins, O. D. Prestes, M. B. Adaime, R. Zanella, *Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC-MS/MS*, *Food Chemistry*, 196 (2016) 25-33.

⁶² B. F. Eldridge, *Pesticide application and safety training for applicators of public health pesticides*, California Department of Public Health, Vector Control Technician Certification, Training manual Category A, (2008). Información disponible en: westnile.ca.gov/special/category_a/ (último acceso marzo 2020).

⁶³ *Introducción al conocimiento y prevención de los Contaminantes Orgánicos Persistentes*, Ministerio de Agricultura, alimentación y medio ambiente, Secretaría General Técnica, Centro de publicaciones, Madrid (2012). Documento disponible en: <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/contaminantes-organicos-persistentes-cop/> (último acceso marzo 2020).

⁶⁴ <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/tabid/673/Default.aspx> (último acceso marzo 2020).

⁶⁵ K. S. Kim, S. C. Lee, K. H. Kim, W. J. Shim, S. H. Hong, K. H. Choi, J. H. Yoon, J. G. Kim, *Survey on organochlorine pesticides, PCDD/Fs, dioxin-like PCBs and HCB in sediments from the Han river, Korea*, *Chemosphere*, 75 (2009) 580-587.

⁶⁶ <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v48je20.htm#2.2> (último acceso marzo 2020).

⁶⁷ <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/> (último acceso marzo 2020).

⁶⁸ P. Plaza-Bolaños, A. G. Frenich, J. L. M. Vidal, *Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends*, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 6303-6326.

⁶⁹ R. Simon, J. A. G. Ruiz, C. von Holst, T. Wenzl, E. Anklam, *Results of a European inter-laboratory comparison study on the determination of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in edible vegetable oils*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391 (2008) 1397-1408.

⁷⁰ T. Wenzl, R. Simon, J. Kleiner, E. Anklam, *Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union*, *Trends in Analytical Chemistry*, 25 (2006).

⁷¹ L. C. Sander, M. M. Schantz, S. A. Wise, *Chapter 14: Environmental analysis: Persistent organic pollutants*, 404-449. In: *Liquid Chromatography. Applications*, 2nd Edition, Elsevier Inc., Editors S. Fanali, P. R. Haddad, C. Poole, M. L. Riekkola (2017).

⁷² <https://www.epa.gov/environmental-topics/water-topics> (último acceso marzo 2020).

⁷³ *Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de Agosto de 2013 por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas*, *Diario Oficial de la Unión Europea*, L226/1.

⁷⁴ *Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria*, *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L31 (2002) 1.

⁷⁵ www.efsa.europa.eu/ (último acceso marzo 2020).

⁷⁶ https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en (último acceso marzo 2020).

⁷⁷ *Reglamento (CEE) N° 315/93 del Consejo de 8 de febrero de 1993 por el que se establecen procedimientos comunitarios en relación con los contaminantes presentes en los productos alimenticios*, *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L37 (1993) 1.

⁷⁸ EU Pesticides Database (2019).

<http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN> (último acceso marzo 2020).

⁷⁹ *Reglamento (CE) N° 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de mayo de 2009 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) n° 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) n° 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo*, *Diario Oficial de la Unión Europea*, L152/11.

⁸⁰ A. Masiá, M. M. Suarez-Varela, A. Llopis-González, Y. Picó, *Pesticides and veterinary drug residues determination in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review*, *Analytica Chimica Acta*, 936 (2016) 40-61.

⁸¹

http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/home/aecosan_inicio.htm (último acceso marzo 2020).

⁸² Codex Alimentarius. Normas Internacionales de los alimentos: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/es/> (último acceso marzo 2020).

⁸³ <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/list-standards/en/> (último acceso marzo 2020).

⁸⁴ Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo de 26 de junio de 1990 por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal, Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L224 (1990) 1. Versión consolidada disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=LEGISSUM:l21152&from=ES> (último acceso marzo 2020).

⁸⁵ Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo, Diario Oficial de la Unión Europea, L70 (2005) 1.

⁸⁶ Reglamento (UE) N° 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal, Diario Oficial de la Unión Europea, L15/1.

⁸⁷ SANTE/12682/2019. *Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed*, European Commission, Directorate General for Health and Food Safety (2020).

⁸⁸ Decisión de la comisión de 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados (2002/657/CE), Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L221/8.

⁸⁹ Decisión de la comisión de 13 de marzo de 2003 por la que se modifica la Decisión 2002/657/CE en cuanto al establecimiento de límites mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL) para determinados residuos de alimentos de origen animal (2003/181/CE), Diario Oficial de la Unión Europea, L71/17.

⁹⁰ Reglamento (CE) N° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de octubre de 2009 relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo, Diario Oficial de la Unión Europea, L309 (2009) 1.

⁹¹ Reglamento de Ejecución (UE) N° 844/2012 de la Comisión de 18 de septiembre de 2012 por el que se establecen las disposiciones necesarias para la aplicación del procedimiento de renovación de las sustancias activas de conformidad con el Reglamento (CE) n°1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a la comercialización de productos fitosanitarios, Diario Oficial de la Unión Europea, L252 (2012) 26.

⁹² Reglamento (UE) N° 283/2013 de la Comisión de 1 de marzo de 2013 que establece los requisitos sobre datos aplicables a las sustancias activas, de conformidad con el Reglamento (CE) n° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios, Diario Oficial de la Unión Europea, L93 (2013) 1.

⁹³ Reglamento (UE) N° 284/2013 de la Comisión de 1 de marzo de 2013 que establece los requisitos sobre datos aplicables a los productos fitosanitarios, de conformidad con el Reglamento (CE) n° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios, Diario Oficial de la Unión Europea, L93 (2013) 85.

⁹⁴ Directiva 96/23/CE del Consejo de 29 de abril de 1996 relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE, Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L125 (1996) 10.

⁹⁵ Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de noviembre de 2001 por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios, Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L311 (2001) 1.

⁹⁶ Reglamento (CE) N° 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea de Medicamentos, Diario Oficial de la Unión Europea, L136 (2004) 1.

⁹⁷ Code of Federal Regulation (CFR) Title 21: *Food and Drugs, Part 556-Tolerances for residues of new animal drugs in food*. 2019. Silver Spring (MD): US Food and Drug Administration. Disponible en: <https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=085a41355598f2919b6655098a466757&mc=true&node=sp40.21.82.f&rn=div6> (último acceso marzo 2020).

⁹⁸ <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?cfrpart=556> (último acceso marzo 2020).

⁹⁹ https://www.aoac.org/AOAC_Prod_Imis/AOAC_Member/Default.aspx?WebsiteKey=2e25ab5a-1f6d-4d78-a498-19b9763d11b4&hkey=8fc2171a-6051-4e64-a928-5c47dfa25797 (último acceso marzo 2020).

¹⁰⁰ EFSA (European Food Safety Authority). *Report for 2016 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products*. EFSA supporting publication: EN-1358. 75 pp. doi:10.2903/sp.efsa.2018.EN-1358 (2018).

¹⁰¹ 21 CFR Part 530: *Topical nitrofurans; extralabel animal drug use; order of prohibition*, Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Federal Register, Vol. 67, No. 25, 2002, 5470.

¹⁰² http://www.aecosan.mssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/contenido_extra_5_LMR_en_transformados.pdf (último acceso marzo 2020).

¹⁰³ <https://zenodo.org/record/1488653#.XZ4i2fZuKM8> (último acceso marzo 2020).

¹⁰⁴ <https://www.epa.gov/pesticides> (último acceso marzo 2020).

¹⁰⁵ J. de Boer, H. Leslie, S. P. J. van Leeuwen, J.-W. Wegener, B. van Bavel, G. Lindström, N. Lahoutifard, H. Fiedler, *United Nations Environment Programme Capacity Building Pilot Project – Training and interlaboratory study on persistent*

organic pollutant analysis under the Stockholm Convention, *Analytica Chimica Acta*, 617 (2008) 208-215.

¹⁰⁶ *Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas*, *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L327/1.

¹⁰⁷ *Decisión N° 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de noviembre de 2001 por la que se aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE*, *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L331/1.

¹⁰⁸ <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf> (último acceso marzo 2020).

¹⁰⁹ <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulation-table> (último acceso marzo 2020).

¹¹⁰ *Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008, relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE*, *Diario Oficial de la Unión Europea*, L348/84.

¹¹¹ *Directiva 2009/90/CE de 31 de julio de 2009 por la que se establecen, de conformidad con la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las especificaciones técnicas del análisis químico y del seguimiento del estado de las aguas*, *Diario Oficial de la Unión Europea*, L201/36.

¹¹² *Directiva 98/83/CE del Consejo de 3 noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano*, *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L330/32.

¹¹³ *Directiva (UE) 2015/1787 de la Comisión de 6 de octubre de 2015 por la que se modifican los anexos II y III de la Directiva 98/83/CE del Consejo, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano*, *Diario Oficial de la Unión Europea*, L260/6.

¹¹⁴ *Reglamento (UE) N° 756/2010 de la Comisión de 24 de agosto de 2010 por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 850/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre contaminantes orgánicos persistentes, en lo que se refiere a los anexos IV y V*, *Diario Oficial de la Unión Europea*, L223/20.

¹¹⁵ *Reglamento (UE) N° 757/2010 de la Comisión de 24 de agosto de 2010 por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 850/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre contaminantes orgánicos persistentes, con respecto a los anexos I y III*, *Diario Oficial de la Unión Europea*, L223/29.

¹¹⁶ *Reglamento (UE) N° 519/2012 de la Comisión de 19 de junio de 2012, por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 850/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre contaminantes orgánicos persistentes, con respecto al anexo I*, *Diario Oficial de la Unión Europea*, L159/1.

¹¹⁷ *Real Decreto 60/2011, de 21 de enero, sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas*, *Boletín Oficial del Estado*, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 19 (2011) 6854.

¹¹⁸ *Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad*

ambiental, Boletín Oficial del Estado, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 219 (2015).

¹¹⁹ *Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano*, Boletín Oficial del Estado, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 45 (2003).

¹²⁰ *Real Decreto 902/2018*, Boletín Oficial del Estado, Ministerio de la Presidencia, Relaciones con las Cortes e Igualdad, 185 (2018) 77350.

¹²¹ A. Leitner, P. Zöllner, W. Lindner, *Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, *Journal of Chromatography A*, 939 (2001) 49-58.

¹²² A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, S. Walker, M. Widmer, *Determination of nitrofurantoin and chloramphenicol residues by high resolution mass spectrometry versus tandem quadrupole mass spectrometry*, *Analytica Chimica Acta*, 862 (2015) 41-52.

¹²³ F. Aldeek, K. C. Hsieh, O. N. Ugochukwu, G. Gerard, W. Hammack, *Accurate quantitation and analysis of nitrofurantoin metabolites, chloramphenicol, and florfenicol in seafood by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Method validation and regulatory samples*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (2018) 5018-5030.

¹²⁴ C. Bock, P. Gowik, C. Stachel, *Matrix-comprehensive in-house validation and robustness check of a confirmatory method for the determination of four nitrofurantoin metabolites in poultry muscle and shrimp by LC-MS/MS*, *Journal of Chromatography B*, 856 (2007) 178-189.

¹²⁵ H. An, L. Parrales, K. Wang, T. Cain, R. Hollins, D. Forrest, B. Liao, H. C. Paek, J. Sram, *Quantitative analysis of nitrofurantoin metabolites and chloramphenicol in shrimp using acetonitrile extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection: a single laboratory validation*, *Journal of AOAC International*, 98 (2015) 602-608.

¹²⁶ A. El-Demerdash, F. Song, R. K. Reel, J. Hillegas, R. E. Smith, *Simultaneous determination of nitrofurantoin metabolites and chloramphenicol in shrimp with a single extraction and LC-MS/MS analysis*, *Journal of AOAC International*, 98 (2015) 595-601.

¹²⁷ S. Chumanee, S. Sutthivaiyakit, P. Sutthivaiyakit, *New reagent for trace determination of protein-bound metabolites of nitrofurans in shrimp using liquid chromatography with Diode Array detector*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (2009) 1752-1759.

¹²⁸ A. Sannino, L. Bolzoni, M. Bandini, *Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables*, *Journal of Chromatography A*, 1036 (2004) 161-169.

¹²⁹ S. Cortés-Aguado, N. Sánchez-Morito, F. J. Arrebola, A. G. Frenich, J. L. M. Vidal, *Fast screening of pesticides residues in fruit juice by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry*, *Food Chemistry*, 107 (2008) 1314-1325.

¹³⁰ <https://www.quechers.com/index.php> (último acceso marzo 2020).

¹³¹ M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Štajnbaher, F. J. Schenck, *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive*

solid-phase extraction" for the determination of pesticide residue in produce, *Journal of AOAC International*, 86 (2003) 412-431.

¹³² A. Lozano, L. Rajska, S. Uclés, N. Belmonte-Valles, M. Mezcuca, A. R. Fernández-Alba, *Evaluation of zirconium dioxide-based sorbents to decrease the matrix effect in avocado and almond multiresidue pesticide analysis followed by gas chromatography tandem mass spectrometry*, *Talanta*, 118 (2014) 68-83.

¹³³ S. J. Lehotay, K. Maštovská, A. R. Lightfield, *Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables*, *Journal of AOAC International*, 88 (2005) 615-629.

¹³⁴ V. C. Fernandes, V. F. Domingues, N. Mateus, C. Delerue-Matos, *Analysing organochlorine pesticides in strawberry jams using GC-ECD, GC-MS/MS and QuEChERS sample preparation*, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29 (2012) 1074-1084.

¹³⁵ European Standards CSN EN 15662. *Foods of plant origin – Multimethod for the determination of pesticide residues using GC – and LC – based analysis following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE – Modular QuEChERS – method*, European Committee for Standardization (2018). Disponible en: <https://www.cen.eu/Pages/default.aspx> (último acceso marzo 2020).

¹³⁶ AOAC Official Method 2007:01. "Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate".

¹³⁷ T. Rejczak, T. Tuzimski, *Recent trends in sample preparation and liquid chromatography/mass spectrometry for pesticide residue analysis in food and related matrices*, *Journal of AOAC International*, 98 (2015) 1143-1162.

¹³⁸ C. Ferrer, A. Lozano, A. Agüera, A. J. Girón, A. R. Fernández-Alba, *Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables*, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 7634-7639.

¹³⁹ J. L. Benedé, J. L. Anderson, A. Chisvert, *Trace determination of volatile polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters by magnetic ionic liquid-based stir bar dispersive liquid microextraction*, *Talanta*, 176 (2018) 253-261.

¹⁴⁰ I. Fulara, M. Czapkicka, *Methods for determination of polybrominated diphenyl ethers in environmental samples – review*, *Journal of Separation Science*, 35 (2012) 2075-2087.

¹⁴¹ J. Wang, Y. Bi, G. Pfister, B. Henkelmann, K. Zhu, K.W. Schramm, *Determination of PAH, PCB, and OCP in water from the Three Gorges Reservoir accumulated by semipermeable membrane devices (SPMD)*, *Chemosphere*, 75 (2009) 1119-1127.

¹⁴² X. Zhao, H. Zhang, J. Fan, D. Guan, H. Zhao, Y. Ni, Y. Li, J. Chen, *Dioxin-like compounds in sediments from the Daliao River Estuary of Bohai Sea: Distribution and their influencing factors*, *Marine Pollution Bulletin*, 62 (2011) 918-925.

¹⁴³ M. Verta, S. Salo, M. Korhonen, T. Assmuth, H. Kiviranta, J. Koistinen, P. Ruokojärvi, P. Isosaari, P.-A. Bergqvist, M. Tysklind, I. Cato, J. Vikelsøe, M.M. Larsen, *Dioxin concentrations in sediments of the Baltic Sea – A survey of existing data*, *Chemosphere*, 67 (2007) 1762-1775.

¹⁴⁴ N. Ochiai, T. Ieda, K. Sasamoto, Y. Takazawa, S. Hashimoto, A. Fushimi, K. Tanabe, *Stir bar sorptive extraction and comprehensive two-dimensional gas*

chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry for ultra-trace analysis of organochlorine pesticides in river water, Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 6851-6860.

¹⁴⁵ US EPA. *Method 1613*, Revision B, EPA 821-B94-0059. Office of Water, US EPA, Washington, DC. Disponible en: <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/organics/dioxins/index.cfm>; 1994 (último acceso marzo 2020).

¹⁴⁶ S. Fu, J. Fan, Y. Hashi, Z. Chen, *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples using online microextraction by packed sorbent coupled with gas chromatography-mass spectrometry*, Talanta, 94 (2012) 152-157.

¹⁴⁷ J. Ma, R. Xiao, J. Li, J. Yu, Y. Zhang, L. Chen, *Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples by solid-phase extraction using multi-walled carbon nanotubes as adsorbent coupled with gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 5462-5469.

¹⁴⁸ S. Ozcan, A. Tor, M. E. Aydin, *Application of magnetic nanoparticles to residue analysis of organochlorine pesticides in water samples by GC/MS*, Journal of AOAC International, 95 (2012) 1343-1349.

¹⁴⁹ I. Domínguez, R. R. González, F. J. A. Liébanas, J. L. M. Vidal, A. G. Frenich, *Automated and semi-automated extraction methods for GC-MS determination of pesticides in environmental samples*, Trends in Environmental Analytical Chemistry, 12 (2016) 1-12.

¹⁵⁰ N. Barco-Bonilla, R. Romero-González, P. Plaza-Bolaños, J. L. Fernández-Moreno, A. G. Frenich, J. L. M. Vidal, *Comprehensive analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater using stir bar sorptive extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry*, Analytica Chimica Acta, 693 (2011) 62-71.

¹⁵¹ F.J. Camino-Sánchez, A. Zafra-Gómez, S. Cantarero-Malagón, J. L. Vilchez, *Validation of a method for the analysis of 77 priority persistent organic pollutants in river water by stir bar sorptive extraction in compliance with the European Water Framework Directive*, Talanta, 89 (2012) 322-334.

¹⁵² F. Hernández, T. Portolés, E. Pitarch, F. J. López, *Target and nontarget screening of organic micropollutants in water by solid-phase microextraction combined with gas chromatography/high-resolution time-of-flight mass spectrometry*, Analytical Chemistry, 79 (2007) 9494-9504.

¹⁵³ X. F. Chen, H. Zang, X. Wang, J. G. Cheng, R. S. Zhao, C. G. Cheng, X. Q. Lu, *Metal-organic framework MIL-53(Al) as a solid-phase microextraction adsorbent for the determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by gas chromatography-tandem mass spectrometry*, Analyst, 137 (2012) 5411-5419.

¹⁵⁴ I. Domínguez, F. J. Arrebola, R. Romero-González, A. Nieto-García, J. L. M. Vidal, A. G. Frenich, *Solid phase microextraction and gas chromatography coupled to magnetic sector high resolution mass spectrometry for the ultra-trace determination of contaminants in surface water*, Journal of Chromatography A, 1518 (2017) 15-24.

¹⁵⁵ J. A. López-López, E. Ogalla-Chozas, P. A. Lara-Martín, M. G. Pintado-Herrera, *Solvent bar micro-extraction (SBME) based determination of PAHs in seawater samples*, Science of the Total Environment, 598 (2017) 58-63.

¹⁵⁶ B. Hashemi, P. Zohrabi, K. H. Kim, M. Shamsipur, A. Deep, J. Hong, *Recent advances in liquid-phase microextraction techniques for the analysis of environmental pollutants*, Trends in Analytical Chemistry, 97 (2017) 83-95.

¹⁵⁷ M. Fernández, S. Clavijo, R. Forteza, V. Cerdá, *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons using lab on valve dispersive liquid-liquid microextraction coupled to high performance chromatography*, Talanta, 138 (2015), 190-195.

¹⁵⁸ Y. Li, G. Wei, X. Wang, *Determination of decabromodiphenyl ether in water samples by single-drop microextraction and RP-HPLC*, Journal of Separation Science, 30 (2007) 2698-2702.

¹⁵⁹ Y. Li, G. Wei, J. Hu, X. Liu, X. Zhao, X. Wang, *Dispersive liquid-liquid microextraction followed by reversed phase-high performance liquid chromatography for the determination of polybrominated diphenyl ethers at trace levels in landfill leachate and environmental water samples*, Analytica Chimica Acta, 615 (2008) 96-103.

¹⁶⁰ S. Gómez-Lavín, D. Gorri, A. Irabien, *Assessment of PCDD/Fs and PCBs in sediments from the Spanish Northern Atlantic Coast*, Water Air Soil Pollution, 221 (2011) 287-299.

¹⁶¹ H. Liu, Q. Zhang, Z. Cai, A. Li, Y. Wang, G. Jiang, *Separation of polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzo-furans in environmental samples using silica gel and florisil fractionation chromatography*, Analytica Chimica Acta, 557 (2006) 314-320.

¹⁶² Y. S. Kim, H. Eun, T. Katase, H. Fujiwara, *Vertical distributions of persistent organic pollutants (POPs) caused from organochlorine pesticides in a sediment core taken from Ariake bay, Japan*, Chemosphere, 67 (2007) 456-463.

¹⁶³ E. Spinnel, C. Danielsson, P. Haglund, *Rapid and cost-effective analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans in soil, fly ash and sediment certified reference materials using pressurized liquid extraction with an integrated carbon trap*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 390 (2008) 411-417.

¹⁶⁴ M. Nunes, P. Marchand, A. Vernisseau, B. Le Bizec, F. Ramos, M. A. Pardal, *PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in sediment and biota from the Mondego estuary (Portugal)*, Chemosphere, 83 (2011) 1345-1352.

¹⁶⁵ O.S. Okay, B. Karacık, S. Başak, B. Henkelmann, S. Bernhöf, K.-W. Shramm, *PCB and PCDD/F in sediments and mussels of the Istanbul strait (Turkey)*, Chemosphere, 76 (2009) 159-166.

¹⁶⁶ V. C. Fernandes, S. J. Lehotay, L. Geis-Asteggiante, H. Kwon, H. G. J. Mol, H. van der Kamp, N. Mateus, V. F. Domingues, C. Delerue-Matos, *Analysis of pesticide residues in strawberries and soils by GC-MS/MS, LC-MS/MS and two-dimensional GC-time-of-flight MS comparing organic and integrated pest management farming*, Food Additives & Contaminants: Part A, 31 (2014) 262-270.

¹⁶⁷ A. Conneely, A. Nugent, M. O'Keeffe, P. P. J. Mulder, J. A. van Rhijn, L. Kovacsics, A. Fodor, R. J. McCracken, D. G. Kennedy, *Isolation of bound residues of nitrofurans from tissue by solid-phase extraction with determination by liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometric detection*, Analytica Chimica Acta, 483 (2003) 91-98.

¹⁶⁸ Y. Fillâtre, D. Rondeau, A. Jadas-Hécart, P. Y. Communal, *Advantages of the scheduled selected reaction monitoring algorithm in liquid*

chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry multi-residue analysis of 242 pesticides: a comparative approach with classical selected reaction monitoring mode, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24 (2010) 2453-2461.

¹⁶⁹ F. Hernández, J. V. Sancho, M. Ibáñez, E. Abad, T. Portolés, L. Mattioli, *Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403 (2012) 1251-1264.

¹⁷⁰ N. Barco-Bonilla, J. L. M. Vidal, A. G. Frenich, R. Romero-González, *Comparison of ultrasonic and pressurized liquid extraction for the analysis of polycyclic aromatic compounds in soil samples by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry*, *Talanta*, 78 (2009) 156-164.

¹⁷¹ V. N. Fishman, G. D. Martin, L. L. Lamparski, *Comparison of a variety of gas chromatographic columns with different polarities for the separation of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans by high-resolution mass spectrometry*, *Journal of Chromatography A*, 1139 (2007) 285-300.

¹⁷² J. A. Gómez-Ruiz, T. Wenzl, *Evaluation of gas chromatography columns for the analysis of the 15+1 EU-priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393 (2009) 1697-1707.

¹⁷³ E. J. Reiner, R. E. Clement, A. B. Okey, C. H. Marvin, *Advances in analytical techniques for polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and dioxin-like PCBs*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386 (2006) 791-806.

¹⁷⁴ A. García-Bermejo, M. Ábalos, J. Sauló, E. Abad, M. J. González, B. Gómara, *Triple quadrupole tandem mass spectrometry: a real alternative to high resolution magnetic sector instrument for the analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, furans and dioxin-like polychlorinated biphenyls*, *Analytica Chimica Acta*, 889 (2015) 156-165.

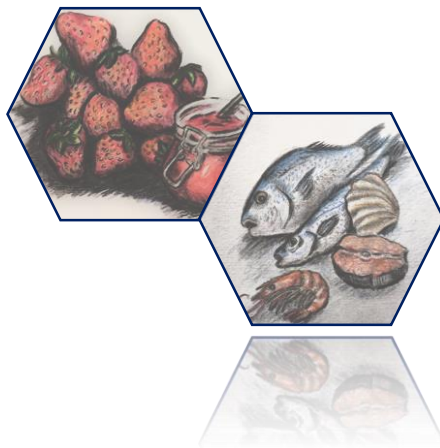
¹⁷⁵ K. L. Organtini, L. Haimovici, K. J. Jobst, E. J. Reiner, A. Ladak, D. Stevens, J. W. Cochran, F. L. Dorman, *Comparison of atmospheric pressure ionization gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry to traditional high-resolution mass spectrometry for the identification and quantification of halogenated dioxins and furans*, *Analytical Chemistry*, 87 (15) (2015) 7902-7908.

¹⁷⁶ A. C. Peterson, G. C. McAlister, S. T. Quarmby, J. Griep-Raming, J. J. Coon, *Development and characterization of a GC-enabled QLT-Orbitrap for high-resolution and high-mass accuracy GC/MS*, *Analytical Chemistry*, 82 (2010) 8618-8628.

CAPÍTULO II

SEGURIDAD ALIMENTARIA

Determinación de contaminantes en muestras alimentarias mediante UHPLC-MS/MS



1. INTRODUCCIÓN

El sector de la alimentación es, sin duda, un sector básico para la economía y hoy en día los mercados exigen que, tanto a nivel local como internacional, la producción de alimentos esté libre de residuos y contaminantes tóxicos que puedan constituir un riesgo para la población. Asimismo, en relación a la exportación de alimentos, existen barreras cada vez más exigentes en lo que a la inocuidad alimentaria se refiere. En este contexto está demostrado que, en particular, el consumo de productos del mar y de frutas contribuye al aporte de múltiples beneficios nutricionales para el ser humano. Sin embargo estos alimentos pueden representar también una fuente potencial de diversos contaminantes, pudiendo a su vez repercutir negativamente sobre la salud del consumidor final.

En lo que a los productos del mar se refiere, debido al crecimiento continuo del comercio internacional de aquellos procedentes de la acuicultura, a la expansión en la variedad de especies acuáticas criadas, y al aumento de las enfermedades (dado el crecimiento de la acuicultura intensiva y la globalización de los mercados), se ha incrementado el uso de medicamentos veterinarios ^(1,2). Entre los antibióticos que se han empleado durante años como aditivos de los piensos formulados, nos concierne mencionar a los nitrofuranos y sus metabolitos, cuyo uso está actualmente prohibido en la UE debido a su carácter carcinogénico y mutagénico. Para estos compuestos, además, la legislación ha

¹ V. F. Samanidou, E. N. Evaggelopoulou, *Review: Analytical strategies to determine antibiotic residues in fish*, Journal of Separation Science, 30 (2007) 2549-2569.

² A. Sapkota, A. R. Sapkota, M. Kucharski, J. Burke, S. McKenzie, P. Walker, R. Lawrence, *Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities*, Environment International, 34 (2008) 1215-1226.

establecido un estricto MRPL de 1 µg/kg en productos de la acuicultura (3).

Por otro lado, en el caso específico de las frutas procesadas (confituras, jaleas, mermeladas, purés, frutas en almíbar...), éstas constituyen la principal categoría de alimentos procesados derivados de la fruta fresca y actualmente son ampliamente consumidas en toda Europa. No obstante, el uso de plaguicidas (herbicidas, fungicidas, insecticidas, etc.) en los cultivos y en el almacenamiento post-cosecha de la fruta fresca es necesario con el objetivo de garantizar que el producto final goce de la mejor calidad posible. Así, residuos tóxicos de estos plaguicidas utilizados pueden persistir en el producto final pese al mecanismo de procesado al que se somete a esta fruta para su comercialización. En este caso, actualmente no existe una legislación específica para la presencia de plaguicidas en frutas procesadas, pero la UE sí establece LMRs para un extenso número de estos compuestos en la fruta fresca (4).

Por todo lo anteriormente citado, es necesario el desarrollo de metodologías analíticas fiables, sensibles y selectivas para la determinación de los residuos de nitrofuranos y plaguicidas en estas matrices a niveles traza de concentración (conforme a la legislación vigente) para su aplicación en análisis de rutina o programas de monitorización.

En general, para el análisis de los nitrofuranos en productos del mar se requiere una primera etapa de derivatización e hidrólisis ácida de la

³ *Decisión de la comisión de 13 de marzo de 2003 por la que se modifica la Decisión 2002/657/CE en cuanto al establecimiento de límites mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL) para determinados residuos de alimentos de origen animal (2003/181/CE)*, Diario Oficial de la Unión Europea, L71/17.

⁴ *EU Pesticides Database* (2020). <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN> (último acceso febrero 2020)

muestra (para liberar los metabolitos enlazados a las proteínas) ⁽⁵⁾. La extracción normalmente se lleva a cabo mediante SLE y limpieza mediante SPE o LLE ^(5,6). En el caso de los plaguicidas en fruta procesada, la técnica de extracción más aplicada es la SLE conocida como método QuEChERS ^(7,8).

En lo referente a la determinación instrumental, la aplicación de UHPLC-MS/MS permite la optimización de métodos analíticos rápidos capaces de cumplir con los requerimientos de fiabilidad, sensibilidad y selectividad previamente mencionados.

En este segundo capítulo de la presente Tesis se propone, por tanto, el desarrollo de dos métodos de análisis diferentes mediante UHPLC-MS/MS en el ámbito de la seguridad alimentaria a fin de la determinación de: *i)* 4 metabolitos de los nitrofuranos en productos del mar y *ii)* 250 plaguicidas en frutas procesadas.

Por un lado, el método desarrollado para los metabolitos de los nitrofuranos comprende una etapa de tratamiento de la muestra que consiste en una derivatización e hidrólisis ácida simultánea, seguida por una SPE. Dicha metodología ha sido completamente validada en gamba (en términos de recuperación, linealidad, precisión, límites de detección,

⁵ F. Aldeek, K. C. Hsieh, O. N. Ugochukwu, G. Gerard, W. Hammack, *Accurate quantitation and analysis of nitrofurantoin metabolites, chloramphenicol, and florfenicol in seafood by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Method validation and regulatory samples*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66 (2018) 5018-5030.

⁶ A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, S. Walker, M. Widmer, *Determination of nitrofurantoin and chloramphenicol residues by high resolution mass spectrometry versus tandem quadrupole mass spectrometry*, Analytica Chimica Acta, 862 (2015) 41-52.

⁷ D. Moreno-González, P. Pérez-Ortega, B. Gilbert-López, A. Molina-Díaz, J. F. García-Reyes, A. R. Fernández-Alba, *Evaluation of nanoflow liquid chromatography high resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in food*, Journal of Chromatography A, 1512 (2017) 78-87.

⁸ B. Reichert, I. R. Pizzutti, I. H. Costabeber, A. Uclés, S. Herrera, A. R. Fernández-Alba, *Validation and application of micro flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of pesticide residues in fruit jams*, Talanta, 134 (2015) 415-424.

cuantificación, CC α y CC β) conforme a los requerimientos del MRPL fijado por la UE, y aplicada al análisis de muestras reales de otros productos del mar.

En cuanto al segundo trabajo de plaguicidas en fruta procesada, se ha aplicado el método QuEChERS con tampón citrato ⁽⁹⁾ modificado y sin etapa de limpieza. El método se ha validado además en puré de fresa, conforme a las directrices establecidas por la Guía SANTE 11813/2017 ⁽¹⁰⁾ (en términos de ventana de tiempo de retención, selectividad/especificidad, límite de cuantificación, rango de trabajo, coeficiente de correlación, recuperación, precisión e incertidumbre), cumpliendo los requisitos para su acreditación mediante la norma ISO/IEC 17025:2005. Esta metodología ha sido, asimismo, aplicada al análisis en rutina de otras muestras de fruta procesada, detectándose la presencia de plaguicidas a concentraciones superiores a 0,01 mg/kg.

⁹ European Standards CSN EN 15662. *Foods of plant origin – Multimethod for the determination of pesticide residues using GC – and LC – based analysis following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE – Modular QuEChERS – method*, European Committee for Standardization (2018). Disponible en: <https://www.cen.eu/Pages/default.aspx> (Último acceso febrero 2020)

¹⁰ SANTE/ 11813/2017. *Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed*, European Commission, Directorate General for Health and Food Safety (2017).

2. DETERMINACIÓN DE LOS METABOLITOS DE NITROFURANOS EN PRODUCTOS DEL MAR MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ULTRA ALTA PRESIÓN ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TRIPLE CUADRUPOLO

Resumen

Un nuevo método analítico ha sido desarrollado para la determinación simultánea de 4 metabolitos de nitrofuranos en productos del mar mediante UHPLC-QqQ-MS/MS. El procedimiento de extracción se basó en una etapa de hidrólisis ácida y derivatización simultáneas utilizando 2-NBA, seguida por una etapa de SPE. La recuperación se estudió fortificando blancos de muestra a dos niveles de concentración (1 y 10 µg/kg), obteniéndose valores en el rango de 73-100% y 79-103%, respectivamente. Los valores de precisión, expresados como RSD fueron $\leq 19\%$ para precisión intra-día y $\leq 23\%$ para la inter-día. La linealidad se estudió en el rango de 1-50 µg/kg, obteniéndose coeficientes de determinación (R^2) $\geq 0,9900$ para todos los analitos. Los LODs para los metabolitos derivatizados fueron de 0,5-0,8 µg/kg, y los LOQs se establecieron a 1 µg/kg, mientras que los valores estimados para CC_α y CC_β oscilaron de 1,5 a 2,6 µg/kg y 1,6 a 3,1 µg/kg, respectivamente. Finalmente, el método fue aplicado al análisis de muestras alimentarias, pero no se detectó la presencia de nitrofuranos.

2.1. INTRODUCCIÓN

Los nitrofuranos son medicamentos de amplio espectro antibacteriano que han sido ampliamente usados a nivel mundial en medicina veterinaria o como aditivos en piensos para animales productores de alimentos. Su uso ha estado principalmente focalizado en el tratamiento

de infecciones gastrointestinales (1,2), siendo considerados como los antibacterianos más empleados en alimentos (3). Así, estos antibióticos han sido utilizados en aves de corral, ganado porcino y vacuno, pescado criado en piscifactorías y gambas (2). El extenso uso de los nitrofuranos en animales productores de alimentos se ha debido a su bajo coste, disponibilidad y eficacia elevada frente a infecciones resistentes. No obstante, estos compuestos fueron prohibidos como medicamentos veterinarios en la UE (4) y US (5) debido a su actividad carcinogénica y mutagénica (2,6) y el peligro que por ello representan para la salud humana. De hecho, los nitrofuranos (incluyendo furazolidona) fueron clasificados recientemente por la Regulación de la Comisión (UE) N° 37/2010 (4) como sustancias prohibidas para las cuales no puede establecerse un LMR. Por esta razón, el JECFA no recomienda ningún LMR para los nitrofuranos (7) y no es posible encontrarlos dentro del listado de LMRs fijados por el Codex para medicamentos veterinarios (8). Adicionalmente, la UE ha establecido un MRPL de 1 µg/kg para cada metabolito en carne de ave y productos de la acuicultura (9,10).

Los nitrofuranos más importantes son furazolidona, furaltadona, nitrofurazona y nitrofurantoín y sus metabolitos, AOZ, AMOZ, SEM y AHD, respectivamente. Estos compuestos no persisten en el tejido comestible debido a que son rápidamente metabolizados, pero sus metabolitos tóxicos se enlazan fuertemente a las proteínas y son muy estables durante largos períodos de tiempo (varias semanas o incluso meses). Por tanto, debido al rápido metabolismo de los nitrofuranos, el análisis de éstos se basa en la determinación de sus principales metabolitos (1).

En el transcurso de los años 2009 y 2010, un extenso número de notificaciones sobre residuos de medicamentos veterinarios en la UE

informaron acerca de la presencia de metabolitos de los nitrofuranos, principalmente en crustáceos, predominantemente gambas. Esta tendencia se vio significativamente incrementada con respecto a 2008 (11,12), de modo que el desarrollo de nuevos métodos analíticos resulta necesario con fines de monitorización para detectar la presencia de estos metabolitos en productos alimentarios. Teniendo en cuenta el extremadamente bajo MRPL establecido para los nitrofuranos (1µg/kg), el principal desafío de su determinación es conseguir unos LODs muy bajos.

En general, el análisis de los nitrofuranos requiere una hidrólisis ácida de la muestra (por ejemplo, con ácido clorhídrico diluído, HCl) para liberar los metabolitos de las proteínas, proceso que a menudo se lleva a cabo simultáneamente junto a una etapa de derivatización. La extracción de los metabolitos libres se realiza normalmente mediante SLE, y una subsecuente limpieza por LLE o SPE (2, 13-15). Para la limpieza mediante SPE se han utilizado cartuchos poliméricos y de NH₂ en distintas matrices alimentarias (1), tales como carne (16-22), gamba (17,23), pescado (24) y cangrejo de río (25). Adicionalmente, se ha aplicado una limpieza extra del extracto final mediante LLE con hexano para eliminar el contenido lipídico en las muestras (24).

La determinación de los metabolitos de los nitrofuranos se ha llevado a cabo por LC acoplada a detección mediante fluorescencia (26,27) o MS (28,29). La retención y separación en columnas de fase reversa resulta desfavorable para estos metabolitos debido a su elevada polaridad. Por ello, es altamente recomendable la aplicación de una etapa de derivatización con 2-NBA (1) con el fin de incrementar la hidrofobicidad de los compuestos. Además, los nitrofenil derivados (NP) obtenidos presentan mayores masas moleculares que los compuestos originales,

mejorando así la detección mediante MS y minimizado la influencia del ruido de fondo del MS (29).

El objetivo de este estudio es el desarrollo de un método analítico para la determinación simultánea de cuatro metabolitos de nitrofuranos, AOZ, AMOZ, AHD y SEM, en productos del mar, mediante UHPLC-QqQ-MS/MS. Con este propósito, se ha optimizado un método de extracción simplificado y una etapa de derivatización. Además, se propone el uso de la técnica de UHPLC, basada en la reducción del tamaño de partícula de la fase estacionaria (< 2 µm), para solventar el problema de consumo de tiempo durante el análisis cromatográfico y para incrementar la sensibilidad, con el objetivo de obtener LOQs iguales o inferiores al MRPL establecido por la UE.

2.2. EXPERIMENTAL

2.2.1. Materiales and reactivos

Los patrones analíticos de los metabolitos AOZ, AMOZ, SEM-HCl y AHD-HCl (purezas siempre > 99%) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Madrid, España). 2-NBA fue asimismo adquirido de Sigma-Aldrich (nota: NBA es un posible mutágeno, así que es importante evitar su inhalación y usar únicamente dentro de una campana de extracción de humos). Las disoluciones primarias de los compuestos individuales (con concentraciones entre 205-374 mg/L) se prepararon mediante disolución del patrón sólido en 50 mL de metanol (MeOH), obtenido de J. T. Baker (Deventer, Holanda). Estas disoluciones fueron almacenadas a -30°C en la oscuridad hasta su uso, siendo estables durante un período de al menos 6 meses (16,21).

El acetonitrilo (ACN), acetato de etilo (AcOEt) y el hexano fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, mientras que el sulfato de magnesio anhidro (97%) y el hidrógeno fosfato de sodio (99%) de Panreac

(Barcelona, España), ciclohexano de Scharlau (Barcelona, España), formiato amónico y ácido fórmico de Fluka (Buchs, Suiza), Bondesil-C18 de Varian (Palo alto, CA, US), y citrato trisódico (99%), cloruro de sodio (99,5%), sulfato de sodio anhidro (99%), acetato de sodio (99%), hidróxido sódico (NaOH, 97%), HCl (37%) y Florisil fueron suministrados por J. T. Baker.

Para la SPE, los cartuchos OASIS HLB (200 mg/6 cm³) y C18 Sep-Pak (500 mg/6 cm³) fueron adquiridos de Waters (Milford, MA, US).

El agua ultrapura, empleada en la preparación de todas las soluciones acuosas y la fase móvil, se obtuvo de un sistema de agua Milli-Q Gradient (Millipore, Bedford, MA, US).

Los tubos de polipropileno de 50 mL y los microtubos de 2 mL usados para la extracción y los filtros de nylon Millex-GC de 0,2 µm fueron suministrados por Millipore (Millipore, Carrigrohill, Irlanda).

2.2.2. Instrumentos y aparatos

Los análisis cromatográficos se llevaron a cabo en un cromatógrafo de líquidos 1290 Infinity series adquirido de Agilent (Santa Clara, CA, US). Para la separación cromatográfica se utilizó una columna C18 Kinetex (50 mm × 2,1 mm, 2,6 µm de tamaño de partícula) de Phenomenex (Torrance, CA, US). Los análisis de MS se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo modelo 6460A de Agilent (Santa Clara, CA, US) con una fuente de iones Jet Stream™ de nitrógeno que funciona en el modo de ionización ESI+. Los parámetros de la fuente fueron los siguientes: temperatura del gas de secado, 325°C; temperatura del gas de revestimiento, 400°C; flujo del gas de secado, 10 L/min; flujo del gas de revestimiento, 12 L/min; presión del nebulizador, 25 psi; y voltaje del capilar, 4000 V.

La detección de los analitos se llevó a cabo utilizando el modo SRM (3 transiciones para cada ion precursor). Se usó la adquisición mediante SRM dinámico y los valores de *dwell time* fueron fijados automáticamente por el software de acuerdo a los tiempos de retención. Las diferentes transiciones y otros parámetros de MS óptimos aparecen enumerados en la **Tabla 2.1**.

El control del equipo, la adquisición de datos y los análisis se llevaron a cabo utilizando el software Mass Hunter Workstation (Agilent).

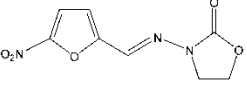
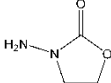
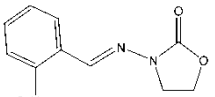
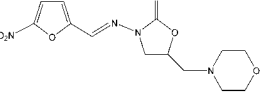
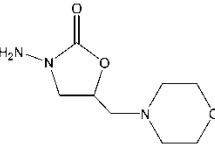
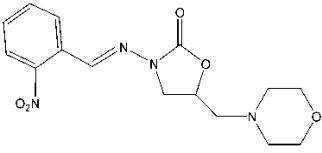
Se usó un agitador rotatorio Reax-2 de Heidolph (Schwabach, Alemania) para la etapa de extracción de muestras y una centrífuga Centronic II de alto volumen de JP Selecta (Barcelona, España).

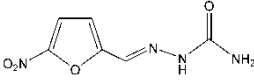
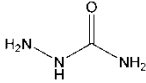
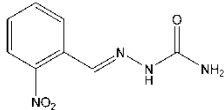
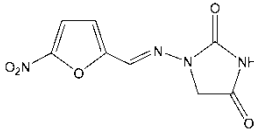
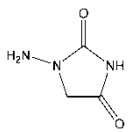
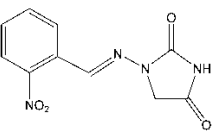
Las extracciones mediante SPE se llevaron a cabo usando un sistema colector de SPE suministrado por Waters (Milford, MA, USA). La evaporación y concentración se realizó usando un evaporador en línea Büchi Syncore (Flawil, Suiza) y un concentrador de muestras Stuart (Stone, Staffordshire, Reino Unido) equipado con un calentador de bloque.

2.2.3. Procedimiento de extracción

Se pesaron 2,5 g de muestra de gamba homogeneizada en tubos de polipropileno de 50 mL, añadiéndose 10 mL de una disolución acuosa de HCl (0,2 M) y 100 µL de una disolución de 2-NBA (0,1 M) recién preparada en MeOH. A continuación, la mezcla fue agitada, llevándose a cabo la hidrólisis, extracción y derivatización simultáneas mediante la incubación de las muestras toda la noche a 37°C en la oscuridad. Después, se neutralizó adicionando 1,5 mL de hidrógeno fosfato de sodio (0,1 M) y 0,2 mL de NaOH (2,5 M), y las muestras se sometieron a

Tabla 2.1. Condiciones de UHPLC-MS/MS y ventanas de tiempo de retención (RTWs) para los metabolitos de los nitrofuranos.

Nitrofurano original	Metabolito	Metabolito derivatizado	RTW (min)	Voltaje fragmentación (V)	Transición cuantificación (energía de colisión, eV)	Transiciones confirmación (energía de colisión, eV)	RI ^a (%)
 Furazolidona MW ^b = 225,2	 AOZ MW = 102,1	 NP-AOZ MW = 235,1	1,87-1,97	110	236 >134 (4)	236>104 (16) 236>51(60)	58,7 15,4
 Furalfadona MW=324,3	 AMOZ MW = 201,2	 NP-AMOZ MW = 334,2	2,19-2,31	110	335>291 (4)	335>100 (28) 335>262(10)	34,4 25,0

Nitrofurano original	Metabolito	Metabolito derivatizado	RTW (min)	Voltaje fragmentación (V)	Transición cuantificación (energía de colisión, eV)	Transiciones confirmación (energía de colisión, eV)	RI ^a (%)
 Nitrofurazona MW = 198,1	 SEM MW = 75,1	 NP-SEM MW = 208,1	1,90-2,05	50	209>166 (4)	209>192 (4) 209>91(20)	81,1 29,9
 Nitrofurantoína MW = 238,2	 AHD MW = 115,1	 NP-AHD MW = 248,1	1,81-1,92	110	249>104(20)	249>76 (44) 249>134(4)	49,7 189,6

^aRI: relación de iones; ^bMW: peso molecular

agitación durante unos segundos. Subsecuentemente, los tubos se centrifugaron a 4000 rpm (1681g) durante 5 min y los sobrenadantes se limpiaron mediante SPE utilizando cartuchos OASIS HLB (acondicionamiento: 5 mL de acetato de etilo, 5 mL de MeOH y 5 mL de agua Milli-Q). Una vez cargada la muestra (el volumen completo de sobrenadante), los cartuchos se lavaron con 5 mL de agua seguidos por 5 mL de MeOH en agua al 30%. La elución de los analitos se llevó a cabo con 6 mL de acetato de etilo y el eluato fue evaporado hasta sequedad bajo una corriente suave de nitrógeno. El residuo resultante se volvió a disolver en 1 mL de fase móvil (formiato amónico 10 mM/MeOH, 50:50, *v/v*). Finalmente, los extractos fueron filtrados utilizando un filtro de 0,2 μm y transferidos a un vial de 2 mL, inyectándose 5 μL de muestra en el sistema cromatográfico.

2.2.4. Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico se llevó a cabo utilizando la elución en gradiente, empleando como fase móvil MeOH (eluyente A) y una solución acuosa de formiato amónico 10 mM (eluyente B). El análisis comenzó con un 20% del eluyente A, que se incrementó linealmente hasta el 100% en 3,5 min. Esta composición se mantuvo durante 1 minuto. A continuación, se incluyó un tiempo de reequilibrio de 1 minuto, obteniéndose un tiempo total de análisis de 5,5 minutos para cada muestra. El flujo de trabajo utilizado fue de 0,3 mL/min y el volumen de inyección de 5 μL . La temperatura de la columna C18 se mantuvo a 30°C.

2.2.5. Protocolo de validación

La detección de los compuestos se basó en las ventanas de tiempo de retención (RTWs), definidas como el promedio del tiempo de retención

\pm tres veces la desviación estándar del tiempo de retención ($RT \pm 3SD$) obtenida mediante el análisis de 10 blancos de muestra fortificados a $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ para cada compuesto (**Tabla 2.1**).

La selectividad del método fue evaluada utilizando blancos de muestra como control. La ausencia de cualquier señal al mismo tiempo de retención de los analitos cuando se monitorizaron las transiciones mostradas en la **Tabla 2.1**, indicó la inexistencia de interferentes de la matriz que pudieran dar una señal de falso positivo. Además, la identificación se llevó a cabo comparando la relación de las transiciones más intensas monitorizadas para cada compuesto con las obtenidas usando muestras fortificadas. La **Tabla 2.1** muestra las relaciones de iones, considerándose una identificación fiable si dicha relación cumplía los criterios establecidos por la UE ⁽³⁰⁾.

El área de pico se usó como respuesta y la linealidad del método fue evaluada mediante curvas de calibración en matriz utilizando muestras de gamba blancas fortificadas previamente a la extracción a niveles de concentración en el rango de 1 a $50 \mu\text{g}/\text{kg}$. Los estudios de recuperación fueron llevados a cabo utilizando blancos de gamba ($n=3$) a dos niveles de concentración (1 y $10 \mu\text{g}/\text{kg}$) con el objetivo de evaluar la veracidad del método. La precisión del método fue estimada realizando estudios de precisión intra-día (repetibilidad) e inter-día (reproducibilidad), expresadas como desviación estándar relativa, RSD. La precisión intra-día se estimó a los mismos niveles de concentración evaluados en el estudio de recuperación (1 y $10 \mu\text{g}/\text{kg}$), analizando tres réplicas a cada nivel, mientras que la precisión inter-día se evaluó fortificando tres muestras a 1 y $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=3$) en días diferentes.

Adicionalmente, se calcularon los LODs y LOQs, definidos como la concentración más baja de analito a la cual la relación señal-ruido era

igual que 3 y 10, respectivamente. Y para completar el procedimiento de validación, se estimaron CC_{α} y CC_{β} utilizando el procedimiento de la curva de calibración, aplicando el valor del MRPL (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) como LMR⁽³¹⁾.

2.2.6. Muestras

Se adquirieron gambas y langostinos frescos de mercados locales ubicados en la provincial de Almería (España). Las muestras, una vez picadas y homogeneizadas, fueron almacenadas en un congelador a -30°C hasta su análisis. Aquellas muestras de gamba y langostinos en las que no se detectó la presencia de los analitos estudiados, fueron usadas como blancos en la preparación de las rectas de calibración y en los estudios de recuperación realizados para la optimización y validación del procedimiento.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Análisis mediante UHPLC-MS/MS

La optimización de los parámetros del MS (voltaje de fragmentación y energía de colisión) se llevó a cabo realizando varias inyecciones (sin separación en el LC) de una solución intermedia de los metabolitos de los nitrofuranos derivatizados (20 mg/L) en MeOH, utilizando ESI+ como fuente de ionización. Dicha optimización fue realizada con el software Optimizer™, que automáticamente determinó el ion precursor y el voltaje de fragmentación óptimo mediante varias inyecciones de la disolución arriba descrita trabajando en el modo “*off-column*”. A continuación, fijando el voltaje de fragmentación óptimo, se procedió a fragmentar el ion precursor cambiando la energía de colisión, proponiendo el software un número determinado de posibles iones producto. De estos iones, se seleccionaron aquellos que mostraban una

mayor abundancia y relación m/z (hasta un total de tres). Además, se utilizó la transición más intensa con fines de cuantificación, mientras que las otras dos transiciones fueron empleadas para la identificación de los analitos (**Tabla 2.1**).

Con el objetivo de optimizar las condiciones cromatográficas, se evaluaron distintas fases móviles (datos no mostrados), empleando MeOH como disolvente orgánico y diversas disoluciones acuosas de ácido fórmico, acetato y formiato amónico a diferentes concentraciones. Los resultados mostraron que la mayor sensibilidad se obtenía utilizando MeOH y una solución acuosa de formiato amónico (10 mM), de modo que ambos se seleccionaron como componentes de la fase móvil para el resto de experimentos. Se evaluaron además otros parámetros tales como la temperatura de la columna (30-40°C), flujo de trabajo (0,2-0,4 mL/min), volumen de inyección (5 y 10 μ L) y el gradiente de fase móvil, seleccionándose como condiciones óptimas de trabajo las que se indican en la **Sección 2.2.4**. Finalmente, la **Figura 2.1** es un ejemplo de un cromatograma de los metabolitos de los nitrofuranos a 1 μ g/kg obtenido mediante UHPLC-MS/MS.

Por otro lado, se llevó a cabo un estudio de la estabilidad de los metabolitos de los nitrofuranos derivatizados mediante la inyección de estándares en matriz de los compuestos derivatizados a 50 μ g/kg, sometidos a tres condiciones de almacenamiento diferentes: a temperatura ambiente, en el frigorífico (5°C) y en el congelador (-30°C). En general, se observó que los compuestos eran estables al menos una semana después de su preparación en todas las condiciones de almacenamiento evaluadas.

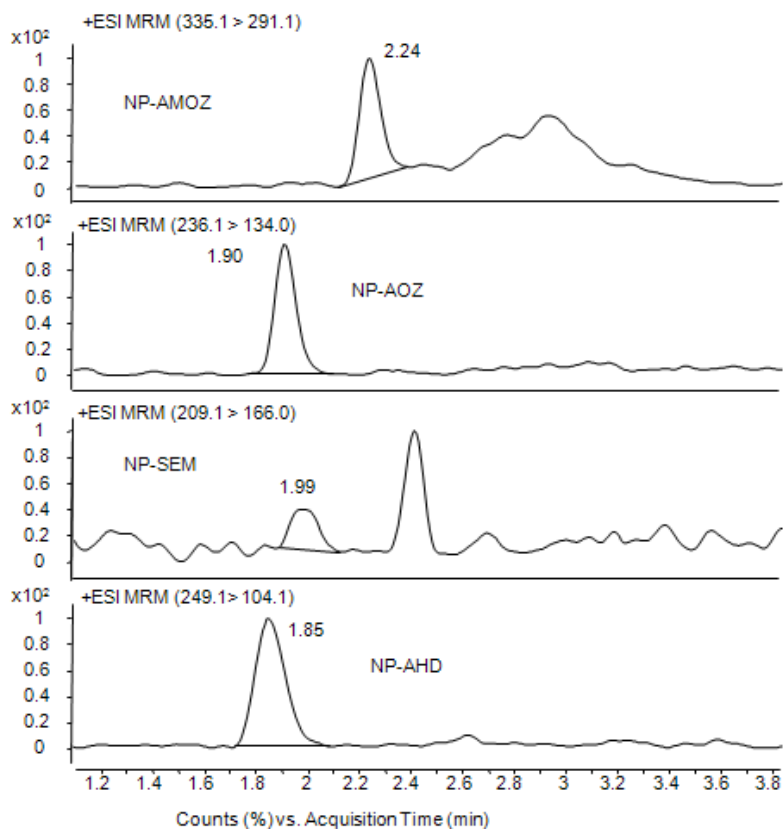


Figura 2.1. Cromatogramas de los metabolitos de los nitrofuranos en gambas fortificadas a 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ obtenidos mediante UHPLC-MS/MS.

2.3.2. Optimización del procedimiento de extracción

Los métodos consultados en bibliografía requieren de una gran cantidad de tiempo, especialmente debido a la necesidad de la etapa de derivatización. En primer lugar, se evaluaron tres procedimientos de tratamiento de muestra a fin de optimizar las principales etapas del método: extracción, hidrólisis y derivatización. Los experimentos se realizaron utilizando alícuotas de 2,5 g de blancos de muestra de gambas fortificadas a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Primero, se llevó a cabo una etapa de hidrólisis y extracción simultáneas utilizando acetonitrilo (ácido fórmico al 1%), aplicando una fase final de derivatización durante toda

la noche (temperatura $\approx 37^{\circ}\text{C}$) con 2-NBA (Método 1). Por otro lado, se evaluó un método diferente realizando una etapa de hidrólisis y derivatización simultáneas en primer lugar (agua 1% ácido fórmico y 2-NBA), y llevando a cabo después la extracción (acetonitrilo al 1% de ácido fórmico) (Método 2).

Y finalmente, en el Método 3, la hidrólisis (agua con ácido fórmico al 1%), la extracción (acetonitrilo con fórmico al 1%) y la derivatización (2-NBA) se llevaron a cabo de forma separada en el orden mencionado. Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla 2.2** y, en general, los mejores fueron los obtenidos ejecutando las tres etapas separadamente (Método 3). Sin embargo, las recuperaciones para el metabolito NP-SEM fueron demasiado bajas en todos los casos evaluados (<47%).

Tabla 2.2. Valores de recuperación (%) obtenidos a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para algunos de los diferentes procedimientos de extracción evaluados.

	Extracción con ACN			
	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4
	<i>Hidrólisis + Extracción^a/ Derivatización</i>	<i>Hidrólisis + Derivatización^b/ Extracción</i>	<i>Hidrólisis/ Extracción/ Derivatización^c</i>	<i>Hidrólisis/ Extracción/ Concentración/ Derivatización</i>
Compuesto	% Recuperación (% RSD ^d)			
NP-AOZ	106 (29)	36 (3)	70 (3)	62 (12)
NP-AMOZ	102 (16)	29 (1)	104 (2)	103 (4)
NP-SEM	N.E. ^e	13 (21)	47 (43)	24 (267)
NP-AHD	118 (69)	165 (1)	99 (8)	136 (14)

^aEtapas de hidrólisis y extracción realizadas simultáneamente; ^bEtapas de hidrólisis y derivatización aplicadas simultáneamente; ^cEtapas de hidrólisis, extracción y derivatización realizadas de forma independiente; ^dRSD: desviación estándar relativa ($n = 3$); ^eN.E.: no extraído (recuperación < 10%).

A fin de mejorar los LOQs del método, se incluyó en el procedimiento una etapa de concentración (factor de concentración = 2) en el evaporador en paralelo Syncore utilizando vacío y calentamiento (40°C) después de la hidrólisis y extracción (realizadas ambas separadamente), y aplicando una etapa final de derivatización (Método 4). En general, se observó buena forma y elevada intensidad de los picos cromatográficos, aunque la detección del metabolito NP-SEP continuó siendo problemática en la mayoría de los casos y las recuperaciones de NP-AHD fueron > 120% (Tabla 2.2).

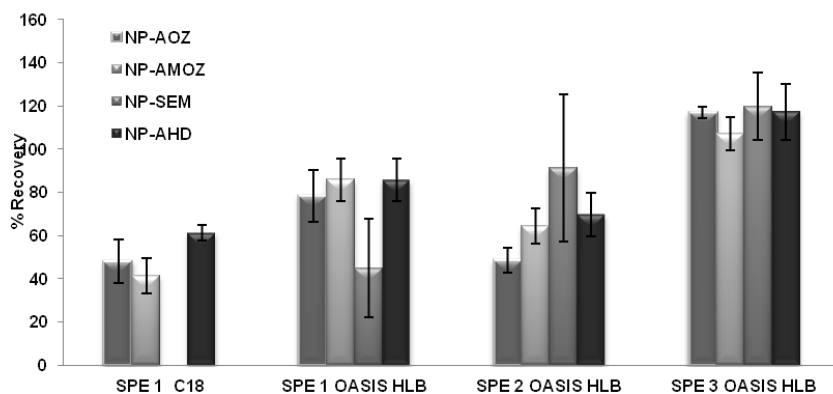


Figura 2.2. Valores de recuperación (%) obtenidos aplicando diferentes procedimientos de limpieza mediante SPE (muestras de gamba fortificadas a 25 µg/kg). Las barras de error indican la desviación estándar (n= 3).

Como consecuencia, después de la extracción y antes de la derivatización (muestras fortificadas a 25 µg/kg), se evaluó una etapa de SPE utilizando cartuchos C18 y OASIS HLB (Método SPE 1), con el objetivo de aplicar simultáneamente una pre-concentración y limpieza de la muestra. Los mejores resultados se obtuvieron usando cartuchos OASIS HLB (Figura 2.2). Es importante notar que los metabolitos fueron más retenidos en el sorbente en su forma derivatizada, por lo que la

reacción de derivatización se aplicó después de la SLE y antes de la SPE (Método SPE 2).

Sin embargo, fue necesaria la introducción de modificaciones adicionales para mejorar la retención de los analitos y los valores de recuperación (**Figura 2.2**). Así, la hidrólisis, extracción y derivatización se llevaron a cabo simultáneamente (adicionando HCl y 2-NBA) y a continuación el pH de la muestra fue ajustado a 7 con hidrógeno fosfato de sodio y NaOH, para minimizar la influencia del pH ácido después de la hidrólisis en la retención en los cartuchos (Método SPE 3). Estas modificaciones mejoraron sustancialmente los resultados dado que todos los metabolitos derivatizados se retuvieron eficazmente en el sorbente (**Figura 2.2**). Finalmente, el método validado fue el Método SPE 3, siendo el procedimiento experimental aplicado el indicado en la **Sección 2.2.3**. Es importante mencionar que los 3 métodos diferentes desarrollados aplicando SPE como limpieza están resumidos en la **Figura 2.3**.

Es necesario señalar que en otros estudios disponibles en bibliografía ⁽²²⁾ se han aplicado métodos de extracción relativamente similares (con etapas de hidrólisis, extracción y derivatización), pero con ciertas diferencias. Por ejemplo, en este trabajo se ha usado un tamaño de muestra inferior (2,5 g) en comparación con otros estudios, tales como el de *Xia y col.* ⁽²²⁾, en el cual se necesitaron 5 g de muestra de carne. Otros estudios han usado incluso cantidades inferiores de muestra, como en el de *Ding y col.* ⁽²⁵⁾, que empleó 2 g, o el de *Douny y col.* ⁽³²⁾, que requirió sólo 1 g de gamba. Aunque el uso de una menor cantidad de muestra reduce la cantidad potencial de material co-extraído en el extracto final, esto también puede afectar negativamente a la precisión del método. En el presente estudio, se han obtenido buenos resultados

usando 2,5 g como solución de compromiso. En relación a la extracción de la muestra, *Finzi y col.* (18) y, más recientemente, *Barbosa y col.* (33), *Douny y col.* (32) y *Radovnikovic y col.* (34), aplicaron una etapa de LLE con acetato de etilo (x 2) antes de la hidrólisis (HCl), derivatización (2-NBA) y ajuste de pH, obteniendo recuperaciones entre 54-130% y valores de RSD inferiores al 20% en términos de repetibilidad. En el presente estudio, por el contrario, no fue necesaria ninguna etapa de LLE, reduciéndose así la manipulación de la muestra, el consumo de disolventes e incrementándose el rendimiento de la muestra.

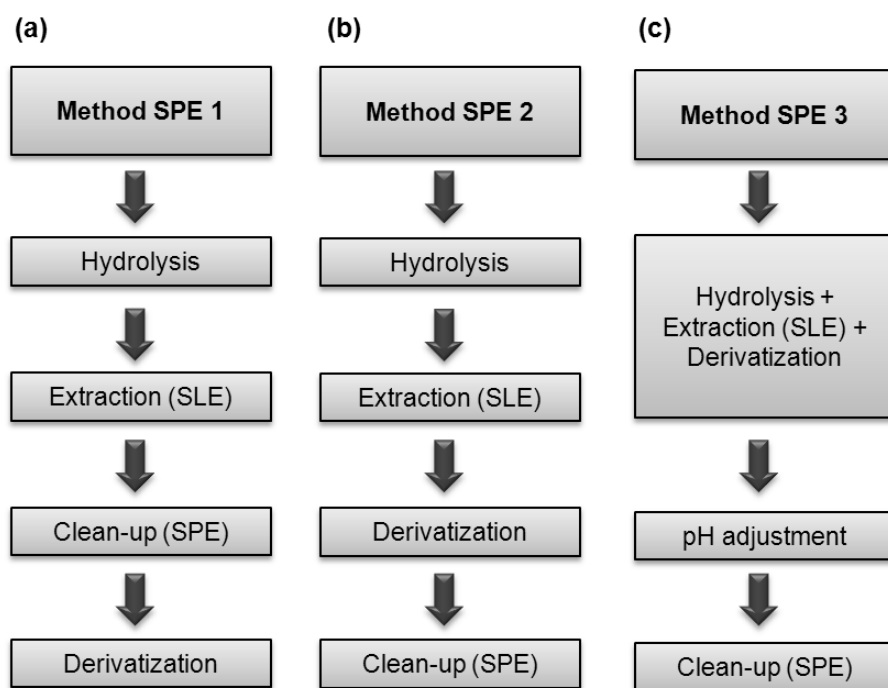


Figura 2.3. Esquema de los diferentes procedimientos de SPE aplicadas en la optimización del método: (a) hidrólisis, extracción, limpieza y derivatización (C18) en etapas separadas; (b) etapas separadas pero con la derivatización previa a la limpieza (OASIS HLB); e (c) hidrólisis, extracción y derivatización simultáneas con limpieza por separado (OASIS HLB).

Una de las mayores ventajas del sistema cromatográfico aplicado en este estudio es el reducido tiempo total de análisis de 5,5 min, lo que permite una adecuada resolución y forma de pico a fin de separar eficientemente los analitos de los interferentes de la matriz. En este sentido, otros métodos ya descritos para el análisis de los metabolitos de nitrofuranos han usado como técnica instrumental HPLC (en lugar de UHPLC), y generalmente presentan tiempos de análisis que van desde 13 ⁽²⁶⁾ a más de 25 min ^(17, 22, 32). Y a pesar de que en el estudio de *Radovnikovic y col.* ⁽³⁴⁾ también se usa un sistema UHPLC, en este caso se requirió un mayor tiempo de análisis, 9 min, para conseguir la separación completa de los metabolitos de los nitrofuranos. Además, necesitaron un mayor volumen de inyección (20 µL) y flujo de trabajo (0,5 mL/min) que en el presente estudio (flujo de 0,3 mL/min y volumen de inyección de 5 µL).

2.3.3. Validación del método

El método optimizado fue validado estudiando linealidad, selectividad, veracidad (expresada como recuperación), precisión intra-día e inter-día, LODs, LOQs, CC_{α} y CC_{β} .

Para todos los compuestos se obtuvo una linealidad adecuada, con coeficientes de determinación (R^2) superiores al 0,9900 dentro del rango de trabajo (**Tabla 2.3**). Los estudios de recuperación se llevaron a cabo tal como se detalla en la **Sección 2.2.5**. La **Tabla 2.3** muestra los valores de recuperación obtenidos, que oscilaron de 73% a 100% a 1 µg/kg, y de 79%-103% a 10 µg/kg. Como puede apreciarse (**Tabla 2.3**), la precisión intra-día fue inferior al 20% para los dos niveles de concentración, mientras que los valores de precisión inter-día fueron también inferiores al 20%, excepto para NP-AMAZ a 1 µg/kg (23%).

Si los resultados de validación obtenidos se comparan con los de métodos previos publicados, puede verificarse que los valores de

recuperación de nuestro estudio (73-103%) coinciden con otros valores descritos en bibliografía (17,24,25) en muestras de productos del mar, que se encuentran en el rango de 79 a 110%. Igualmente, en tales trabajos de investigación se han observado valores de repetibilidad que oscilan entre 0,1 (24) y 22% (25).

Los LODs obtenidos estaban comprendidos en el rango de 0,5 a 0,8 µg/kg, mientras que el LOQ se estableció a 1 µg/kg a fin de facilitar subsecuentes controles de calidad (**Tabla 2.3**). Como puede apreciarse, los LODs calculados son inferiores al MRPL establecido por la UE en animales procedentes de la acuicultura. Finalmente, la **Tabla 2.3** también muestra que los valores de CC_{α} obtenidos se encontraban en el rango de 1,5 (NP-AOZ) a 2,6 µg/kg (NP-SEM), mientras que los de CC_{β} oscilaban de 1,6 (NP-AOZ) a 3,1 µg/kg (NP-SEM) (**Tabla 2.3**). Con respecto a estos resultados, es importante aclarar que los valores de CC_{α} y CC_{β} son más elevados que el MRPL ya que, como se ha mencionado anteriormente, el valor de este límite se ha utilizado reemplazando al LMR en la fórmula para el cálculo de estos parámetros. En este contexto, es preciso mencionar que otros estudios que han realizado validaciones convencionales han estimado los valores de LOQs y LODs para los metabolitos de los nitrofuranos pero no han llevado a cabo el cálculo adicional de CC_{α} y CC_{β} (18,19). Similarmente, en otros estudios diferentes para estos compuestos sólo se calculan los parámetros de CC_{α} y CC_{β} , por ejemplo en el caso de los trabajos de investigación de *Barbosa y col.* (33), *Bock y col.* (17) y *Radovnikovic y col.* (34). Por el contrario, en nuestro estudio hemos estimado los 4 parámetros (LOQ, LOD, CC_{α} y CC_{β}) a fin de validar el método. En este sentido, es necesario matizar que, en comparación con los valores de CC_{α} y CC_{β} obtenidos en la mayoría de los estudios recientes sobre metabolitos de nitrofuranos (32-34), estos

parámetros presentan valores ligeramente más altos en nuestro estudio, pero principalmente debido a la estrategia previamente mencionada para calcularlos.

Sin embargo, es preciso mencionar que algunos de los trabajos más recientes (^{33,34}) analizaron muestras de huevo y plasma, entre otros, en lugar de productos del mar, de modo que los resultados obtenidos no son totalmente comparables.

2.3.4. Análisis de muestras

Para evaluar la aplicabilidad del método validado se analizaron 17 muestras de crustáceos, incluyendo gamba roja y langostinos. Las muestras sometidas a análisis poseían diferente procedencia (salvaje y acuicultura), origen geográfico (UE y países de fuera de la UE) y formato (muestras frescas y congeladas). El control de calidad interno se llevó a cabo con el objetivo de verificar la calidad de los resultados: se evaluaron una calibración en matriz, un blanco de reactivo, un blanco de matriz y varias muestras blancas fortificadas. El blanco de reactivo se preparó realizando el procedimiento completo sin muestra, con el propósito de eliminar posibles falsos positivos procedentes de la contaminación del instrumento o del disolvente usado. Las muestras fortificadas a dos niveles de concentración (1 y 10 µg/kg) se emplearon para el control de la eficacia de extracción.

Las muestras analizadas resultaron negativas para los metabolitos de los nitrofuranos, conforme a la prohibición establecida por la UE de estos compuestos.

Tabla 2.3. Resumen de los principales parámetros de validación del método de UHPLC-MS/MS desarrollado.

Compuesto	Rango lineal (µg/kg)	R ²	Recuperación (RSD intra-día, %) ^a		RSD inter-día (%) ^b		LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	CC _α (µg/kg)	CC _β (µg/kg)
			1 µg/kg	10 µg/kg	1 µg/kg	10 µg/kg				
NP-AOZ	1-50	0,9955	82 (4)	90 (8)	13	15	0,5	1,0	1,5	1,6
NP-AMOZ	1-50	0,9995	73 (4)	79 (6)	23	5	0,6	1,0	2,0	2,3
NP-SEM	1-50	0,9991	100 (13)	103 (15)	3	7	0,6	1,0	2,6	3,1
NP-AHD	1-50	0,9995	80 (10)	99 (19)	11	13	0,8	1,0	2,0	2,2

^an = 3; Los valores de RSD son mostrados entre paréntesis; ^bn = 3.

2.4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado, optimizado y validado un método analítico para la determinación simultánea de los cuatro metabolitos de los nitrofuranos en productos del mar mediante UHPLC-QqQ-MS/MS, de acuerdo a la legislación europea (MRPL = 1 µg/kg). A pesar de los esfuerzos invertidos en desarrollar un método corto, la complejidad intrínseca de la matriz, la necesidad de derivatización y la baja sensibilidad mostrada por los analitos, dificultaron este propósito, de modo que finalmente el procedimiento necesitó dos etapas. El método de extracción optimizado requirió una etapa simple de hidrólisis, extracción y derivatización simultáneas, combinada con una etapa final de limpieza mediante SPE. Adicionalmente, el uso de UHPLC-QqQ-MS/MS permite la optimización de métodos analíticos con tiempos de análisis más cortos (5,5 min) y es capaz de mejorar la sensibilidad y resolución. En relación a los parámetros de validación, se obtuvieron una buena linealidad, y valores más que aceptables de recuperaciones, precisión, LODs, LOQs, CC_{α} y CC_{β} , lo que indica que el método propuesto es apto para ser usado en el análisis en rutina o en programas de monitorización. Además, como puede apreciarse, los LODs obtenidos son inferiores al MRPL fijado por la UE para los metabolitos de los nitrofuranos en productos de la acuicultura. Finalmente, el método fue aplicado al análisis de muestras reales y no se detectó la presencia de estos compuestos a niveles superiores al LOQ.

2.5. REFERENCIAS

- ¹ Garrido-Frenich, A., Plaza-Bolaños, P., Aguilera-Luiz, M.M., Martínez Vidal, J.L. (2009). Chapter 1, *Recent advances in the analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents by chromatographic techniques*. In T. J. Quintin (Ed.), *Chromatography Types, Techniques and Methods* (p.p.1-102). New York, NY, USA: Nova Science Publishers, Inc.
- ² Vass, M., Hruska, K., Franek, M., *Nitrofurant antibiotics: a review on the application prohibition and residual analysis*. *Veterinarni Medicina*, 53 (2008) 469-500.
- ³ Picó, Y., Barceló, D., *The expanding role of LC-MS in analyzing metabolites and degradation products of food contaminants*. *Trends in Analytical Chemistry*, 27 (2008) 821-835.
- ⁴ *Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin*, Official Journal of the European Union, L15 (2010) 1-72.
- ⁵ FDA. Department of Health and Human Services. *Food and Drug Administration, Topical Nitrofurans; Extralabel Animal Drug Use; Order of Prohibition*, Federal Register, 67 (2002) 5470-5471.
- ⁶ FAO/WHO: *Fortieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food. Evaluation of certain veterinary drug residues in food* [Internet] (1993). World Health Organization. Geneva. Disponible en julio, 2012 en: <http://www.who.int/ipcs/publications/jecfa/reports/en/index.html>.
- ⁷ FAO/WHO: *Report of the nineteenth session of the codex committee on residues of veterinary drugs in foods* [Internet] (2010). Joint FAO/WHO Food standards programme, Codex Alimentarius commission. Último acceso julio 2012 en: <http://www.codexalimentarius.net/web/archives.jsp?lang=en>.
- ⁸ Codex Alimentarius. *MRLs for the Compendium of methods of analysis as suitable for support to Codex MRLs*. Disponible en <http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/index.html?lang=en>. (Último acceso julio 2012).
- ⁹ *Commission Decision 2003/181/EC, 13 March 2003, amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum performance limits (MRPLs) for certain residues in food animal origin*, Official Journal of the European Communities, L71 (2003) 17-18.
- ¹⁰ *Council Regulation 2002/1756/EC, 23 September 2002, amending Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs as regards withdrawal of the authorisation of an additive and amending Commission Regulation (EC) No 2430/1999*, Official Journal of the European Communities, L265 (2002) 1-2.
- ¹¹ RASFF (The Rapid Alert System for Food and Feed): *Annual Report 2009*. Directorate General for Health & Consumers, European Commission. Último acceso julio 2012 en: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/docs/report2009_en.pdf.
- ¹² RASFF (The Rapid Alert System for Food and Feed): *Annual Report 2010*. Directorate General for Health & Consumers, European Commission. Último acceso julio 2012 en:

http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/docs/rasff_annual_report_2010_en.pdf.

- 13 Gentili, A., Perret, D., Marchese, S., *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products*. Trends in Analytical Chemistry, 24 (2005) 704–733.
- 14 Samanidou, V.F., Evaggelopoulos, E.N., *Analytical strategies to determine antibiotic residues in fish*. Journal of Separation Science, 30 (2007) 2549–2569.
- 15 Stolker, A.A.M., Brinkman, U.A.Th., *Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review*. Journal of Chromatography A, 1067 (2005) 15–53.
- 16 Barbosa, J., Ferreira, M.L., Ramos, F., Noronha da Silveira, M.I., *Determination of the furaltadone metabolite 5-methylmorpholino-3-amino-2-oxazolidinone (AMAZ) using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry during the nitrofurans crisis in Portugal*, Accreditation and Quality Assurance, 12 (2007a), 543–551.
- 17 Bock, C., Gowik, P., Stachel, C., *Matrix-comprehensive in-house validation and robustness check of a confirmatory method for the determination of four nitrofurans metabolites in poultry muscle and shrimp by LC-MS/MS*. Journal of Chromatography B, 856 (2007) 178–189.
- 18 Finzi, J.K., Donato, J.L., De Nucci, M.S.G., *Determination of nitrofurans metabolites in poultry muscle and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 824 (2005) 30–35.
- 19 Leitner, A., Zöllner, P., Lindner, W., *Determination of the metabolites of nitrofurans antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 939 (2001) 49–58.
- 20 Mottier, P., Khong, S.P., Gremaud, E., Richoz, J., Delatour, T., Goldmann, T., Guy, P.A., *Quantitative determination of four nitrofurans metabolites in meat by isotope dilution liquid chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1067 (2005) 85–91.
- 21 Verdon, E., Couedor, P., Sanders, P., *Multi-residue monitoring for the simultaneous determination of five nitrofurans (furazolidone, furaltadone, nitrofurazone, nitrofurantoin, nifursol) in poultry muscle tissue through the detection of their five major metabolites (AOZ, AMAZ, SEM, AHD, DNSAH) by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry—In-house validation in line with Commission Decision 657/2002/EC*, Analytica Chimica Acta, 586 (2007) 336–347.
- 22 Xia, X., Li, X., Zhang, S., Ding, S., Jiang, H., Li, J., Shen, J., *Simultaneous determination of 5-nitroimidazoles and nitrofurans in pork by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1208 (2008) 101–108.
- 23 Chu, P.S., Lopez, M.I., *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of protein-bound residues in shrimp dosed with nitrofurans*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (2005) 8934–8939.
- 24 Tsai, C.W., Tang, C.H., Wang, W.H., *Quantitative determination of four nitrofurans and corresponding metabolites in the fish muscle by liquid*

- chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry*. Journal of Food and Drug Analysis, 18 (2010) 98–106.
- ²⁵ Ding, T., Xu, J., Shen, C., Wang, K., *Determination of trace level nitrofuran metabolites in crawfish meat by electrospray LC-MS/MS on the Finnigan TSQ Quantum Discovery MAX*. LC-GC North America, 24 (2006) 49.
- ²⁶ Barbosa, J., Moura, S., Barbosa, R., Ramos, F., Noronha da Silveira, M.I., *Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatography-UV photodiode array detection and liquid chromatography ionspray tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 586 (2007b) 359–365.
- ²⁷ Conneely, A., Nugent, A., O’Keeffe, M., Mulder, P.P.J., van Rhijn, J.A., Kovacsics, L., Fodor, A., McCracken, R.J., Kennedy, D.G., *Isolation of bound residues of nitrofuran drugs from tissue by solid-phase extraction with determination by liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometry detection*. Analytica Chimica Acta, 483 (2003) 91–98.
- ²⁸ Balizs, G., Hewitt, A., *Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 492 (2003) 105–131.
- ²⁹ Effkemann, S., Feldhusen, F., *Triple-quadrupole LC-MS-MS for quantitative determination of nitrofuran metabolites in complex food matrixes*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 378 (2004) 842–844.
- ³⁰ *Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC)*, Official Journal of the European Communities, L 211/8.
- ³¹ Verdon, E., Hurtaud-Pessel, D., Sanders, P., *Evaluation of the limit of performance of an analytical method based on a statistical calculation of its critical concentrations according to ISO standard 11843: Application to routine control of banned veterinary drug residues in food according to European Decision 657/2002/EC*, Accreditation and Quality Assurance, 11 (2006) 58–62.
- ³² Douny, C., Widart, J., De Pauw, E., Silvestre, F., Kestemont, P., Tu, H.T., Phuong, N.T., Maghuin-Rogister, G., Scippo, M.-L., *Development of an analytical method to detect metabolites of nitrofurans. Application to the study of furazolidone elimination in Vietnamese black tiger shrimp (Penaeus monodon)*. Aquaculture, 376 – 379 (2013) 54 – 58.
- ³³ Barbosa, J., Freitas, A., Mourão, J.L., Noronha da Silveira, M.I., Ramos, F., *Determination of furaltadone and nifursol residues in poultry eggs by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60 (2012) 4227 – 4234.
- ³⁴ Radovnikovic, A., Moloney, M., Byrne, P., Danaher, M., *Detection of banned nitrofuran metabolites in animal plasma samples using UHPLC-MS/MS*. Journal of Chromatography B, 879 (2011) 159 – 166.

3. DESARROLLO Y VALIDACIÓN COMPLETA DE UN MÉTODO MULTIRRESIDUO PARA EL ANÁLISIS DE UN AMPLIO RANGO DE PLAGUICIDAS EN FRUTAS PROCESADAS MEDIANTE UHPLC-MS/MS

Resumen

Se ha desarrollado un método analítico fiable de 16 minutos para la determinación simultánea de 250 plaguicidas en fruta procesada usando UHPLC-MS/MS, validado de acuerdo a la guía SANTE 11813/2017 y acreditado con éxito bajo la norma ISO 17025. La extracción se llevó a cabo aplicando un método QuEChERS modificado, sin etapa de limpieza, pero incluyendo una dilución para obtener buena forma de pico y reducir el efecto matriz. Los plaguicidas se cuantificaron utilizando calibración en matriz y el método fue validado en términos de ventana de tiempo de retención, linealidad (6-167 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 0,6-16,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, coeficiente $R^2 \geq 0,98$), veracidad (recuperación entre 70-120%), selectividad, precisión (RSD $\leq 20\%$), LOQs (0,6-6,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e incertidumbre. Finalmente, el método se aplicó al análisis en rutina de 103 muestras de fruta procesadas, detectándose la presencia de varios de residuos de plaguicidas, tales como fluopiram, espinosad o ciprodinilo (0,006-0,22 mg/kg).

3.1. INTRODUCCIÓN

El incremento de la demanda mundial de fruta procesada en productos alimentarios básicos, tales como mermeladas, confituras, jalea, purés, zumos de fruta, o fruta en almíbar, entre otros, demuestra que las tecnologías para el procesado y la conservación han ido ganando importancia. El objetivo principal de procesar fruta es poder proporcionar estos alimentos durante todo el año, incluida fuera de

temporada ⁽¹⁾. El procesado de fruta engloba distintos procesos entre los que se incluyen clasificación, lavado, enfriamiento, pelado, escaldado, reducción de tamaño, congelación, deshidratación y enlatado ^(2,3). Además, la preparación de estas frutas procesadas normalmente implica la adición de aditivos, tales como espesantes (pectina como agente gelificante), edulcorantes, que también actúan como conservantes (azúcar y miel), compuestos colorantes y aromatizantes, y acidificantes (por ejemplo, ácido cítrico). Adicionalmente, estos productos se someten a tratamientos térmicos que reducen el contenido en agua, lo que también podría concentrar cualquier residuo de plaguicida presente en la fruta fresca. Por ello, para determinar los residuos de plaguicidas en estos alimentos, se requiere un tratamiento previo más completo en comparación con las frutas frescas.

La aplicación de plaguicidas es necesaria para proteger los cultivos contra las plagas durante la cosecha y la post-cosecha y así garantizar la calidad del producto final, mejorar el rendimiento y reducir las pérdidas económicas ^(4,7). Sin embargo, los residuos de estos plaguicidas pueden persistir en las frutas y ser peligrosos para la salud ^(5,8). En este contexto, la EFSA ⁽⁹⁾ y varios estudios ^(2,10) han constatado que, aunque la cantidad de plaguicidas es mayor en productos sin procesar, continúan detectándose residuos en los procesados ^(8,11-13).

El uso de plaguicidas en alimentos está controlado por varios reglamentos en la UE ^(7,14), fijándose LMRs para estos compuestos en fruta fresca ⁽⁴⁾. Sin embargo, no se han establecido LMRs para las frutas procesadas, de modo que es necesario controlar la presencia de los residuos de plaguicidas en este grupo de alimentos, lo que implica la necesidad de desarrollar métodos analíticos eficientes, sensibles y selectivos para el análisis en rutina que permitan su determinación en

estas matrices. Debido a la complejidad de las frutas procesadas, para eliminar interferentes potenciales de estas matrices e incrementar la sensibilidad, se pueden aplicar etapas de pretratamiento y limpieza. Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, existen pocas publicaciones que describan el análisis en frutas procesadas, excepto en el caso de los zumos de fruta (8,11-13,15,16). En su estudio, *Sannino, Bolzoni y Bandini* (17) determinaron 24 plaguicidas en puré de manzana, zumo de limón concentrado y puré de tomate empleando LC-MS/MS con un tiempo total de análisis de 20 min. Para el pretratamiento de la muestra se aplicó una SLE con acetato de etilo: ciclohexano (1:1, *v/v*). Asimismo, para la determinación de siete insecticidas de benzoilfenilurea en puré de pera para bebés, zumo de limón concentrado y pulpa de tomate, se aplicó una extracción/partición similar, utilizando también LC-MS/MS (18). Más recientemente, *Reichert y col.* (11) analizaron 107 plaguicidas en mermeladas de albaricoque, uva, melocotón, piña y fresa usando LC de micro flujo, μ LC-MS/MS, con un tiempo total de análisis de 14 min. Para la extracción se aplicó el método QuEChERS, aplicando una etapa final de limpieza. Adicionalmente, para la determinación de 14 OCPs en mermelada de fresa se evaluaron tres versiones diferentes de QuEChERS, usando GC-ECD y GC-MS/MS (19). Es importante hacer hincapié en que la mayoría de estos estudios fueron publicados hace ya cierto tiempo, monitorizándose un pequeño número de plaguicidas, centrándose en mermeladas y necesitando la aplicación de una etapa de limpieza.

El principal objetivo de este estudio fue el desarrollo de un método multiresiduo rápido, con una relación coste-efectividad favorable, para el análisis de un amplio rango de 250 plaguicidas utilizando UHPLC-MS/MS, con un tiempo de análisis reducido y combinado con un

método de extracción QuEChERS eficiente para frutas procesadas. Este propósito fue completado con éxito y el método se validó totalmente utilizando puré de fresa, según lo establecido por la guía SANTE/11813/2017 ⁽²⁰⁾, y fue acreditado por la Agencia Nacional de Acreditación y Certificación (ENAC) de España. El método se aplicó además al análisis en rutina de residuos de plaguicidas en cinco tipos diferentes de frutas procesadas.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. Productos químicos y reactivos

Los patrones analíticos de los plaguicidas (pureza entre 92,2 y 100%) se compraron de Dr. Enhrenstofer (Augsburgo, Alemania), Riedel-de-Haën (Seelze-Hannover, Alemania), Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania), Fluka (Steinheim, Alemania), Chem Service (West Chester, PA, US) y HPC Standards GmbH (Borsdorf, Alemania). El fosfato de trifenilo (TPP), usado como estándar interno, fue adquirido de Supelco (Bellefonte, PA, US). El sulfato de magnesio anhidro, cloruro sódico, y el ACN de grado HPLC, se obtuvieron de Panreac (Barcelona, España). El formiato amónico fue comprado de Fluka (Steinheim, Alemania), el ácido fórmico (contenido > 98%) de Honeywell Fluka (Madrid, España) y el metanol LiChrosolv de alta pureza (LC-MS), fue suministrado por Sigma-Aldrich. Para la preparación de tampones, fases móviles y otros reactivos se utilizó agua altamente purificada (Milli-Q, Millipore, Bedford, US). Las disoluciones patrón primarias individuales fueron preparadas disolviendo cada uno de los compuestos (8-100 mg) en acetona o metanol, dependiendo de la solubilidad (concentraciones en el rango de 200-2000 mg/L); estas disoluciones se almacenaron a -21 ± 3 °C por un tiempo máximo de 5 años. La disolución intermedia de trabajo multi-compuesto (6 mg/L de concentración para cada uno

excepto para 3-hidroxi-carbofurano, 0,6 mg/L) se preparó por dilución con metanol y se almacenó a -21 ± 3 °C durante un período máximo de 4 meses.

3.2.2. Instrumentación

Los análisis cromatográficos se llevaron a cabo usando un cromatógrafo de líquidos 1290 Infinity series de Agilent (Santa Clara, CA, US) compuesto por una bomba binaria Infinity 1290 de Agilent, un automuestreador Infinity 1290 de Agilent equipado con un módulo de control de temperatura y un compartimento de columna termostatzado también de Agilent Infinity 1290. Para las separaciones cromatográficas se usó una columna C18 UHPLC BEH (100 mm x 2,1 mm) de Waters (Mildford, MS, US) con un tamaño de partícula de 1,7 μm .

La detección por MS se llevó a cabo usando un espectrómetro de masas Triple Quad™ 5500 de AB Sciex (Foster City, CA, US). El instrumento funcionó con una fuente Turbo VTM y una sonda de ionización por ESI. Las transiciones MRM se monitorizaron con una ventana de detección de 35 s y un tiempo de escáner objetivo de 0,4 s. Los parámetros de la fuente del MS establecidos fueron: cortina de gas de nitrógeno (CUR, nitrógeno de ultra-alta pureza) 25 L/min, gas de colisión (CAD, nitrógeno) $6,2 \cdot 10^4$ Pa, voltaje de pulverización de iones (IS) -4500V, temperatura de la fuente (TEM) 400°C, gas de la fuente 1 (gas nebulizador, GS1) y gas 2 (gas calentador, GS2) $3,1 \cdot 10^5$ Pa. Como gas 1 y 2 se usó aire comprimido.

El control del instrumento y la adquisición de datos se llevó a cabo utilizando el software *Analyst* (versión 1.6.2) y el procesado de dichos datos se realizó mediante el software *Multiquant* (versión 3.0.2) (ambos de AB Sciex).

Las separaciones se llevaron a cabo usando una centrífuga de alto volumen equipada con un rotor de cubeta (4 mL x 400 mL) de Orto Alresa, Mod. Consul 21 (Madrid, España). También se utilizaron un agitador vibratorio COROBTM modelo SIMPLEshake 30 (MO, Italia) y una balanza analítica PL602-L (Mettler Toledo, Greinfesee, Suiza).

3.2.3. Procedimiento de extracción de las muestras

Se aplicó un método de extracción basado en la metodología de QuEChERS⁽²¹⁾ para la determinación de plaguicidas en puré de fresa. Las muestras (10 g) se pesaron en un tubo de centrífuga de 50 mL, adicionándose 10 mL de ACN acidificado con ácido fórmico (1%) y conteniendo TPP (0,05 mg/L), y la mezcla se agitó (agitador vibratorio) 2 min. A continuación, se añadió una mezcla de MgSO₄ anhidro (4 g) y NaCl (1 g), y volvió a agitarse durante otros 2 min. Las muestras se centrifugaron 10 min a 3060 g. Finalmente, se llevó a cabo una dilución 10 con fase móvil, pipeteando 100 µL de sobrenadante en un vial de 2 mL junto con 900 µL de una mezcla de metanol: agua con ácido fórmico al 0,01 % (20:80, *v/v*). Esto contribuyó a minimizar cualquier potencial efecto matriz e interferencia, y mejoró la forma de pico cromatográfica. En los casos de mermelada de fresa y purés concentrados de fresa, arándano, frambuesa y mora, se añadió a las muestras (5 g) 10 mL de agua adicionales junto con los 10 mL de ACN con 0,25 mg/L de TPP, y en la última etapa de dilución, se agregó 800 µL de la mezcla de metanol: agua con ácido fórmico (*v/v*) a 200 µL de sobrenadante.

3.2.4. Análisis cromatográfico

Los análisis cromatográficos se llevaron a cabo usando un programa de elución en gradiente, siendo el eluyente A formiato amónico 2 mM con ácido fórmico (0,1%) y consistiendo el eluyente B en metanol acidificado

con ácido fórmico (0,1%). Los análisis se iniciaron con un 90% del eluyente A, que descendió linealmente hasta un 70% en 2 min, hasta un 50% en 4,3 min, 30% en 7 min, 20% en 8,3 min y 10% en 10 min. Esta composición se mantuvo durante 2 min más antes de retornar al 90% del eluyente A en 0,05 min, seguido por un tiempo de reequilibrio de 3,95 min, para completar un tiempo total de análisis de 16 min (Tabla 2.4). El flujo fue de 0,35 mL/min, manteniéndose la temperatura de la columna a 30°C. El volumen de inyección se fijó en 5 µL.

Tabla 2.4. Programa de elución cromatográfica en gradiente optimizado para separar los plaguicidas analizados.

Tiempo (min)	Disolvente acuoso (%) Formiato amónico 2mM y ácido fórmico 0,1%	Disolvente orgánico (%) Metanol con ácido fórmico 0,1%
0,0	90	10
2,0	70	30
4,3	50	50
7,0	30	70
8,3	20	80
10,0	10	90
12,0	10	90
12,05	90	10
16,0	90	10

3.2.5. Validación del método

El método propuesto fue validado de acuerdo a la guía SANTE/11813/2017 ⁽²⁰⁾ y diseñado con el objetivo de obtener la acreditación oficial de ENAC basada en la norma ISO/IEC 17025:2017. En este contexto, se determinaron los siguientes parámetros: RTW, linealidad y rango de trabajo, selectividad, veracidad (% recuperación), precisión (intra- e inter-día) expresada como RSD, LOQs e incertidumbre. La identificación de los compuestos objeto de estudio se basó en la RTW, definida como el tiempo de retención promedio \pm seis veces la desviación estándar del tiempo de retención ($RT \pm 6SD$) con una

tolerancia de $\pm 0,1$ min ⁽²⁰⁾. Se calculó analizando 8 muestras de blanco fortificadas a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A fin de minimizar el efecto matriz, la linealidad se estimó usando calibración en matriz; se inyectaron muestras de blanco de puré de fresa fortificadas a 5 niveles de concentración entre 6 y 167 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (excepto 0,6-16,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para 3-hidroxi-carbofurano).

La linealidad se evaluó en base a los coeficientes de determinación ($R^2 \geq 0,98$). Análogamente, se estableció el criterio de que cada uno de los puntos individuales de la curva de calibración podía permitirse una desviación, expresada en RSD, dentro del rango de $\pm 20\%$. Con respecto a la selectividad, la respuesta observada en los blancos de reactivo y las muestras de blancos de control debía ser inferior al 30% del LOQ. Los estudios de recuperación se llevaron a cabo fortificando muestras de blanco ($n = 8$) a dos niveles de concentración (6 y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para todos los compuestos, excepto para 3-hidroxi-carbofurano, que fue de 0,6 y 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Se evaluó también la recuperación del TPP, cumpliendo el requerimiento de una recuperación promedio en el rango de 60-130%. Los valores de precisión intra-día (repetibilidad) e inter-día (reproducibilidad) fueron determinados a las mismas dos concentraciones, y expresados como RSD, calculada así:

$$\text{RSD} (\%) = \left(\frac{S_c}{\bar{X}_c} \right) 100$$

S_c : desviación estándar estimada a la concentración c , bajo condiciones de repetibilidad o reproducibilidad, y \bar{X}_c : valor promedio de las 8 réplicas medidas.

Los valores de precisión intra-día se obtuvieron del análisis de 8 muestras fortificadas en el mismo día. Los valores de precisión inter-día se estimaron de la inyección de 8 muestras fortificadas durante 8 días consecutivos. De acuerdo a la guía SANTE ⁽²⁰⁾, la mínima concentración, evaluada por inyección de 8 réplicas, que proporcionó valores de

recuperación (70-120%) y precisión (RSD \leq 20%) aceptables se estableció como LOQ.

La incertidumbre de la medida, expresada como incertidumbre expandida (U), se calculó utilizando una estrategia “de abajo hacia arriba” (enfoque *bottom-up*) basada en datos de validación internos ^(22,23) a dos concentraciones (10 y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 1 y 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para 3-hidroxi-carbofurano). La U se estimó a partir de una incertidumbre estándar combinada (u_y) multiplicada por un factor de cobertura $k = 2$. En este estudio, las principales contribuciones a la incertidumbre total fueron la incertidumbre del sesgo, que incluye la incertidumbre asociada a la preparación de estándares, la incertidumbre asociada con la veracidad y la incertidumbre asociada con la precisión (estudios intra e inter-día) de la validación del método. Por tanto, el modelo matemático para la estimación de la incertidumbre fue el siguiente:

$$u_y^2 = u^2(\Delta_{bias}) + u^2(\delta_{precision})$$

Los valores de U obtenidos deben ser $\leq 50\%$ para el nivel de concentración correspondiente al LOQ y $\leq 40\%$ para concentraciones mayores o iguales que el tercer punto de calibrado.

Adicionalmente, se llevó a cabo la evaluación de la aplicabilidad del método a otras matrices del mismo grupo alimentario mediante inyección para cada una de ellas de una secuencia de muestras constituida por 3 muestras fortificadas (al LOQ = 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para 3-hidroxi-carbofurano) y un blanco en matriz, evaluados junto con un calibrado en matriz en puré de fresa. La recuperación promedio de las muestras fortificadas debía encontrarse en el rango de 70-120%, aunque valores de 60-130% podían ser excepcionalmente aceptados también. Análogamente, la repetibilidad de los resultados, expresada como RSD, debía ser $\leq 20\%$. Esta metodología de verificación se llevó a

cabo para mermelada de fresa, pulpa de fresa y albaricoque, puré concentrado de fresa, frambuesa, mora y arándano, puré de albaricoque, arándano, frambuesa, manzana, pera y melocotón y melocotón en almíbar.

3.2.6. Muestras de frutas procesadas

Un total de 103 muestras fueron adquiridas en las provincias de Huelva, Alicante y Almería (España) y sometidas a análisis siguiendo el procedimiento antes descrito. Las muestras recolectadas abarcaban cinco categorías, dependiendo del procesado de la fruta, adición de edulcorantes y/o tratamientos térmicos ⁽²⁴⁾: pulpa ($n = 7$, fresa y albaricoque), puré ($n = 70$, fresa, albaricoque, arándano, frambuesa, manzana, pera y melocotón), puré concentrado ($n = 24$, fresa, frambuesa, mora y arándano), mermelada ($n = 1$, fresa), y melocotón en almíbar ($n = 1$). Todas las muestras fueron analizadas en un plazo de 24 h máximo desde su adquisición.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Análisis mediante UHPLC-MS/MS

La optimización de los parámetros MS/MS se llevó a cabo utilizando disoluciones individuales de cada compuesto objeto de estudio (preparados en una mezcla de fase móvil a 10 µg/L). Para cada ion precursor (masa $Q1$) se seleccionaron 2 iones producto (masas $Q3$), estableciéndose la transición más sensible con fines de cuantificación y la segunda para confirmación. Otros parámetros, tales como el potencial de reducción (*declustering potential*), energía de colisión, potencial de entrada y potencial de salida de la celda de colisión, se optimizaron simultáneamente para cada transición. Los parámetros restantes, tales como gas 1 y gas 2 de la fuente (35, 40, 45, 50 y $3,8 \cdot 10^5$ Pa fueron evaluados), flujo de gas de cortina (se evaluaron valores de 20, 25, 30 y

35 L/min) y la ventana de detección (se probaron 30, 35 y 45 s), se optimizaron a lo largo de varias inyecciones. El *dwell weight* se fijó inicialmente a 1 para todos los plaguicidas, pero a fin de mejorar la forma de pico, se modificó a valores mayores para aquellos compuestos en los que se observó una menor sensibilidad. Así, se establecieron los siguientes valores de *dwell weight*: 1,5 (en el caso de lenacilo), 2 (metribucina, butoxicarboxim, DMSA, forclorfenurón, haloxifop, terbufos, fluometurón, diclofluanida, flurocloridona, tiofanox-sulfona, fosfato de tricresilo, propoxicarbazona, tiofanato-metilo, metacrifós, amisulbrom, fenpiclonil y forato-sulfona), 3 (abamectina, dinotefuran, bioaletrina, butocarboxim, cimoxanilo, 2,4-D, mepanipirima, triadimenol, triclorfón, dialato, hexitiazox e isoproturón) y 5 (azadiractina) (**Tabla 2.5**).

Teniendo en cuenta que estudios previos ⁽¹³⁾ encontraron que el uso de acetonitrilo proporcionaba peor forma de pico y resolución, así como una señal más baja en el espectro de MS para algunos plaguicidas, se seleccionó metanol acidificado como disolvente para la separación cromatográfica. Como disolventes acuosos, se evaluaron acetato amónico y formiato amónico, seleccionándose el formiato amónico acidificado con ácido fórmico ya que proporcionaba mejor forma de pico cromatográfico. Como puede apreciarse, se acidificaron con ácido fórmico ambas fases, orgánica y acuosa, con el objetivo de mejorar la eficiencia de ionización. Así, la separación efectiva de 250 plaguicidas en 16 min requirió la aplicación de una elución en gradiente con metanol acidificado con ácido fórmico al 0,1% (*v/v*) y formiato amónico (2 mM) con ácido fórmico (0,1%, *v/v*). También se optimizó el flujo de trabajo (0,35 y 0,4 mL/min) y el volumen de inyección (2, 3, 4, 5 y 10 μ L), seleccionándose 0,35 mL/min como óptimo ya que proporcionaba una

mejor resolución y separación cromatográfica, y un volumen de inyección de 5 μL , pues permitía una repetibilidad adecuada entre diferentes inyecciones minimizando la saturación de la señal en el espectrómetro de masas.

Pese a los esfuerzos invertidos en optimizar el gradiente de elución, como puede observarse en los valores de RTW mostrados en la **Tabla 2.5** y en la **Figura 2.4**, la resolución cromatográfica no se alcanzó completamente, ya que se producía la elución de varios plaguicidas a tiempos de retención muy similares. En cierta medida, esto fue inevitable debido al elevado número de plaguicidas analizados. Sin embargo, el uso de la MS/MS trabajando en el modo MRM proporcionó la resolución espectral necesaria para determinar los compuestos de interés satisfactoriamente.

3.3.2. Optimización del procedimiento de extracción

Con el objetivo de desarrollar un método de extracción rápido y efectivo, útil en análisis de rutina, se aplicó el procedimiento QuEChERS⁽²¹⁾ con algunas modificaciones. Estos cambios incluían pesar una menor cantidad de muestra y de sales, reducir el volumen de disolvente, y no aplicar una etapa de limpieza final. Bajo estas condiciones, las recuperaciones de la mayoría de los plaguicidas se encontraban en el rango de 60-130%, excepto para el caso de algunos plaguicidas ácidos (quinclorac, quinmerac, imazapir, imazamox y triclopir), los cuales presentaban bajas recuperaciones debido al efecto matriz. Para solventar este desafío y mejorar estas recuperaciones, se utilizó para la extracción acetonitrilo acidificado con ácido fórmico (1%).

Tabla 2.5. Ventana de tiempo de retención relativa (RTW) y parámetros de validación del método desarrollado en puré de fresa.

Plaguicida*	RTW (min)	Dwell weight (ms)	Repetibilidad (n=8)				Reproducibilidad (n=8)				U		LOQ
			R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	(%) ^a	(%) ^b	RSD (%)
<i>Acefato</i>	1,83-1,83	1,0	78	5	102	4	80	7	77	6	26	21	4
<i>Formetanato</i>	1,80-1,86	1,0	83	4	82	4	103	7	83	6	19	18	5
<i>Aminocarb</i>	1,87-1,87	1,0	86	4	107	3	85	6	83	6	22	17	3
<i>Propamocarb</i>	2,04-2,08	1,0	74	7	95	5	79	10	80	4	30	17	6
<i>Ometoato</i>	2,07-2,13	1,0	73	10	85	3	79	10	78	6	31	21	10
<i>Adicarb-sulfóxido</i>	2,31-2,35	1,0	77	8	91	7	79	6	77	5	27	22	9
<i>Dinotefuran</i>	2,38-2,38	3,0	80	4	107	2	93	7	88	4	21	12	3
<i>Butoxicarboxim</i>	2,50-2,50	2,0	78	7	99	7	84	9	81	7	27	21	7
<i>Aldicarb-sulfona</i>	2,61-2,61	1,0	87	16	93	5	84	11	80	8	33	23	16
<i>Nitenpiram</i>	2,65-2,71	1,0	81	9	90	3	83	12	80	8	32	22	12
<i>Oxamil</i>	2,69-2,69	1,0	87	6	108	6	88	9	83	6	24	18	4
<i>Carbendazima + Benomilo</i>	2,86-2,86	1,0	82	7	96	4	80	7	79	6	26	20	7
<i>Oxidemetón- metilo</i>	2,94-2,94	1,0	72	4	94	3	82	8	81	4	25	16	4
<i>Metomilo</i>	2,94-3,00	1,0	85	6	101	3	89	11	83	8	28	20	7
<i>Flonicamid</i>	3,06-3,06	1,0	74	8	80	5	77	12	73	8	35	28	6
<i>Demetón-S-metilsulfona</i>	3,09-3,15	1,0	73	6	84	3	80	7	77	6	26	22	5
<i>Tiametoxam</i>	3,21-3,21	1,0	71	4	83	4	88	9	83	9	25	21	3
<i>2,6-Diclorobenzamida</i>	3,23-3,29	1,0	71	3	74	3	73	10	70	7	35	29	3
<i>Tiabendazol</i>	3,36-3,36	1,0	72	4	80	4	77	10	79	5	32	20	5
<i>Monocrotofós</i>	3,35-3,39	1,0	72	4	86	3	81	10	79	5	28	19	2
<i>Pirimicarb desmetil</i>	3,39-3,45	1,0	74	3	88	3	79	7	80	5	27	18	3
<i>Atrazina-desisopropil</i>	3,56-3,62	1,0	78	5	89	4	75	6	70	4	30	27	6
<i>Dicrotofós</i>	3,61-3,65	1,0	74	4	93	3	86	11	74	7	29	25	4

Plaguicida*	RTW (min)	Dwell weight (ms)	Repetibilidad (n=8)				Reproducibilidad (n=8)				U		LOQ
			R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	(%) ^a	(%) ^b	RSD (%)
<i>Fuberidazol</i>	3,60-3,66	1,0	78	3	93	4	80	10	81	7	30	20	3
<i>Etiofencarb-sulfona</i>	3,72-3,72	1,0	84	5	92	4	83	10	80	8	29	22	3
<i>Tiofanox-sulfóxido</i>	3,76-3,82	1,0	81	4	94	4	84	9	79	5	28	19	5
<i>Etiofencarb-sulfóxido</i>	3,81-3,85	1,0	74	5	90	3	80	10	81	7	30	20	5
<i>Espirotetramat BYI 08330-enol-glucósido</i>	3,82-3,84	1,0	87	9	110	5	107	15	111	12	30	20	8
<i>Imazapir</i>	3,91-3,91	1,0	80	5	96	3	83	8	80	8	26	22	4
<i>Imidacloprid</i>	3,91-3,91	1,0	91	4	108	4	85	11	84	6	29	17	4
<i>Clotianidina</i>	4,00-4,01	1,0	90	7	103	5	90	9	85	5	25	15	8
<i>Tiofanox-sulfona</i>	4,02-4,08	2,0	80	6	91	4	85	11	82	9	28	23	4
<i>Metiocarb-sulfóxido</i>	4,07-4,13	1,0	74	4	92	3	87	10	83	9	27	21	4
<i>Metamitrona</i>	4,14-4,18	1,0	70	5	75	5	70	11	74	17	38	40	5
<i>Triclorfón</i>	4,18-4,24	3,0	80	6	94	3	81	13	79	8	34	23	6
<i>Vamidotion</i>	4,22-4,28	1,0	77	3	90	2	84	13	84	8	31	20	2
<i>Dimetoato</i>	4,27-4,33	1,0	75	5	87	3	82	10	80	7	29	22	5
<i>3-hidroxi-carbofurano</i>	4,31-4,31	1,0	74	4	90	4	79	15	77	11	37	29	3
<i>Quinmerac</i>	4,36-4,36	1,0	72	3	88	1	84	15	88	12	36	25	3
<i>Acetamiprid</i>	4,35-4,41	1,0	72	6	86	4	76	13	79	8	37	23	6
<i>Cloridazona</i>	4,42-4,42	1,0	78	5	78	3	73	9	73	8	34	27	5
<i>Terbunetón desetil</i>	4,54-4,54	1,0	71	3	81	4	79	13	85	9	34	21	3
<i>Metiocarb-sulfona</i>	4,59-4,59	1,0	70	4	75	4	73	9	70	8	33	30	5
<i>Cimoxanilo</i>	4,61-4,61	3,0	72	4	85	3	79	10	79	5	30	19	4
<i>Imazamox</i>	4,73-4,73	1,0	75	4	96	2	84	13	83	9	33	22	2
<i>Atrazina-desetil</i>	4,74-4,74	1,0	73	3	87	3	75	8	74	5	30	23	2
<i>Oxicarboxina</i>	4,71-4,77	1,0	73	5	94	4	80	11	84	9	31	22	3
<i>Etirimol</i>	4,73-4,77	1,0	75	5	92	2	78	9	76	7	30	24	5

Plaguicida*	RTW (min)	Dwell weight (ms)	Repetibilidad (n=8)				Reproducibilidad (n=8)				U		LOQ
			R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	(%) ^a	(%) ^b	RSD (%)
<i>Pirimicarb</i>	4,73-4,79	1,0	73	3	83	4	78	11	80	12	32	28	2
<i>Tiacloprid</i>	4,87-4,91	1,0	73	3	84	4	77	12	79	6	34	20	2
<i>Ácido acibenzolar</i>	4,98-5,01	1,0	89	6	105	3	89	10	96	11	36	17	4
<i>Triciclazol</i>	5,06-5,12	1,0	77	3	89	3	83	11	82	7	31	20	3
<i>Butocarboxim</i>	5,11-5,17	3,0	74	7	96	7	83	14	80	8	34	23	7
<i>Mesotriona</i>	5,15-5,21	1,0	92	8	108	3	102	12	99	10	27	20	6
<i>Aldicarb</i>	5,22-5,22	1,0	74	4	90	4	81	7	78	8	26	24	4
<i>Metoxuron</i>	5,31-5,31	1,0	71	5	89	4	84	9	81	6	28	19	4
<i>DMSA</i>	5,38-5,44	2,0	75	7	99	3	81	10	79	8	29	22	6
<i>Quinclorac</i>	5,56-5,62	1,0	94	11	112	5	98	9	97	10	25	20	9
<i>Metolcarb</i>	5,58-5,62	1,0	86	6	96	4	88	10	84	8	27	19	6
<i>Fosfamidón</i>	5,64-5,64	1,0	82	4	95	3	89	9	83	6	25	17	4
<i>Carbetamida</i>	5,68-5,68	1,0	74	8	94	6	83	9	81	7	28	20	6
<i>Simetrin</i>	5,67-5,73	1,0	74	5	92	5	84	11	82	7	30	20	4
<i>Cianazina</i>	5,69-5,75	1,0	72	4	83	3	80	15	78	8	38	23	4
<i>Cinosulfurón</i>	5,74-5,74	1,0	79	4	104	4	100	15	100	10	34	20	3
<i>Desmetrina</i>	5,74-5,74	1,0	70	6	89	3	82	10	84	8	29	21	3
<i>Sulcotriona</i>	5,76-5,82	1,0	81	5	98	4	92	8	89	10	22	22	3
<i>Monurón</i>	5,82-5,88	1,0	73	4	94	7	83	10	79	5	29	20	2
<i>Espirotetramat BYI 08330-monohidroxi</i>	5,86-5,89	1,0	86	9	96	5	86	8	95	10	22	25	9
<i>Triasulfurón</i>	5,90-5,96	1,0	77	5	91	7	85	13	87	15	33	32	2
<i>Metribucina</i>	5,92-5,98	2,0	72	7	87	5	75	10	78	12	33	29	7
<i>Tifensulfurón-metilo</i>	5,97-5,97	1,0	71	5	87	5	94	16	98	13	35	27	5
<i>Simacina</i>	5,99-5,99	1,0	74	8	80	3	78	12	76	14	38	33	8
<i>Nicosulfurón</i>	6,03-6,07	1,0	76	6	84	3	96	11	91	8	27	18	7

Plaguicida*	RTW (min)	Dwell weight (ms)	Repetibilidad (n=8)				Reproducibilidad (n=8)				U		LOQ
			R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	(%) ^a	(%) ^b	RSD (%)
<i>Tiofanato-metilo</i>	6,05-6,07	2,0	74	4	95	4	84	15	93	8	19	40	4
<i>Piroxsulam</i>	6,07-6,07	1,0	82	7	105	6	94	12	93	8	29	17	6
<i>Terbumetón</i>	6,05-6,09	1,0	70	6	92	4	81	11	88	10	29	22	3
<i>Bendiocarb</i>	6,07-6,13	1,0	81	5	91	2	82	11	85	5	31	15	5
<i>Ofurace</i>	6,12-6,16	1,0	79	5	93	5	83	10	83	9	30	21	5
<i>Malaoxón</i>	6,12-6,18	1,0	75	4	94	3	84	7	80	11	23	26	3
<i>Metsulfurón metilo</i>	6,13-6,19	1,0	82	7	101	4	96	18	97	10	38	20	7
<i>Propoxicarbazona</i>	6,19-6,23	2,0	84	7	97	5	84	12	88	8	31	20	6
<i>Metosulam</i>	6,29-6,33	1,0	88	4	94	7	104	9	96	7	23	16	5
<i>DMST</i>	6,31-6,37	1,0	73	5	97	5	80	11	82	8	32	22	3
<i>Terbutilacina-desetil</i>	6,36-6,42	1,0	70	5	84	5	76	10	79	7	32	22	4
<i>Fentión-sulfóxido</i>	6,39-6,4	1,0	76	7	94	5	83	7	83	7	25	19	7
<i>Imazalil</i>	6,41-6,45	1,0	79	8	97	5	85	13	83	6	33	18	9
<i>Carbaril</i>	6,47-6,47	1,0	78	13	89	5	84	19	85	14	44	30	11
<i>Clorsulfurón</i>	6,54-6,58	1,0	71	5	89	8	83	19	87	13	43	28	2
<i>Penoxsulam</i>	6,54-6,60	1,0	106	10	108	8	98	19	99	8	41	18	9
<i>Monolinuron</i>	6,55-6,61	1,0	72	8	90	8	89	9	79	10	25	27	7
<i>Ametrina</i>	6,64-6,64	1,0	78	4	97	4	90	10	86	10	26	23	3
<i>Etiofencarb</i>	6,61-6,67	1,0	74	9	91	3	83	12	86	6	32	17	9
<i>Tiodicarb</i>	6,66-6,70	1,0	77	6	94	3	92	8	88	11	22	23	5
<i>Mepanipirima-2-hidroxiopropil</i>	6,68-6,69	1,0	72	7	97	2	83	10	89	5	29	13	6
<i>Azadiractina</i>	6,67-6,70	5,0	103	16	113	5	111	3	108	20	26	23	10
<i>Fostiazato</i>	6,67-6,71	1,0	85	5	99	5	85	11	84	11	31	26	6
<i>Fluometurón</i>	6,75-6,75	2,0	74	6	95	2	81	12	86	7	31	17	5
<i>Climbazol</i>	6,75-6,81	1,0	77	8	103	4	86	13	86	10	31	22	7

Plaguicida*	RTW (min)	Dwell weight (ms)	Repetibilidad (n=8)				Reproducibilidad (n=8)				U		LOQ
			R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	(%) ^a	(%) ^b	RSD (%)
<i>Espirotramat BYI 08330-enol</i>	6,77-6,79	1,0	97	3	115	4	96	8	114	5	25	21	3
<i>Dodemorf</i>	6,79-6,83	1,0	75	14	97	3	86	10	86	7	29	17	12
<i>Forato-sulfóxido</i>	6,82-6,83	1,0	72	6	100	3	85	10	80	9	27	24	3
<i>Disulfotón- sulfóxido</i>	6,81-6,87	1,0	72	9	99	5	84	9	80	11	26	28	8
<i>Clorotolurón</i>	6,89-6,89	1,0	72	6	95	6	84	11	88	11	30	25	6
<i>Metobromurón</i>	6,93-6,93	1,0	72	6	91	6	85	10	83	7	27	20	6
<i>Bromoxinil</i>	6,93-6,94	1,0	88	5	105	3	93	13	85	9	30	22	5
<i>Fenpropidina</i>	6,93-6,94	1,0	82	4	86	4	83	11	83	7	30	20	3
<i>Atrazina</i>	6,94-6,98	1,0	74	7	99	3	81	11	81	7	31	20	7
<i>Disulfotón-sulfona</i>	7,00-7,00	1,0	70	9	98	3	83	10	82	8	28	21	7
<i>Famofos</i>	7,00-7,00	1,0	79	8	107	7	86	14	89	6	34	16	4
<i>Isoprocarb</i>	6,98-7,02	1,0	77	8	100	3	87	12	89	6	30	14	5
<i>Forato-sulfona</i>	6,98-7,02	2,0	73	4	97	3	82	11	84	7	29	19	4
<i>Metabenzthiazurón</i>	7,01-7,02	1,0	74	7	94	3	76	13	89	5	36	13	7
<i>Fenpropimorfo</i>	6,99-7,05	1,0	90	5	91	2	86	10	85	8	27	20	3
<i>Metazacloro</i>	7,04-7,04	1,0	80	6	100	4	86	9	84	6	25	17	5
<i>DEET (N,N-dietil-toluamida)</i>	7,03-7,09	1,0	80	5	99	4	93	14	89	10	31	21	5
<i>Flutriafol</i>	7,07-7,08	1,0	84	7	111	5	90	12	90	8	30	19	7
<i>Lenacilo</i>	7,10-7,16	1,5	74	5	98	6	81	15	81	12	40	29	4
<i>Isoproturón</i>	7,14-7,18	3,0	76	3	95	3	84	10	88	4	27	13	2
<i>Isoxaflutol</i>	7,18-7,19	1,0	89	7	106	7	95	13	92	11	31	23	8
<i>Fensulfotión</i>	7,18-7,24	1,0	79	5	101	5	87	12	89	7	29	16	5
<i>Diurón</i>	7,34-7,38	1,0	78	7	98	3	84	15	86	6	36	16	6
<i>Azaconazol</i>	7,33-7,39	1,0	85	7	108	3	86	15	85	11	35	24	5

Plaguicida*	RTW (min)	Dwell weight (ms)	Repetibilidad (n=8)				Reproducibilidad (n=8)				U		LOQ
			R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	(%) ^a	(%) ^b	RSD (%)
<i>Forclorfenurón</i>	7,34-7,40	2,0	84	5	106	3	87	16	92	10	36	22	5
<i>Espirotram BYI 08330-ketohidroxi</i>	7,35-7,39	1,0	97	7	110	4	92	8	109	6	31	31	4
<i>Dimetacloro</i>	7,38-7,38	1,0	82	11	104	3	86	5	88	8	23	18	11
<i>2,4-D</i>	7,39-7,41	3,0	84	7	99	4	92	12	90	10	29	22	7
<i>Desmedifam</i>	7,44-7,50	1,0	79	9	98	6	93	15	81	9	35	24	8
<i>Espiroxamina</i>	7,46-7,50	1,0	80	2	96	2	85	10	89	7	27	16	2
<i>Metacrifós</i>	7,49-7,49	2,0	86	5	101	4	93	8	86	8	23	20	5
<i>Prometrina</i>	7,47-7,53	1,0	74	3	89	4	88	11	77	9	29	25	3
<i>Clorantraniliprol</i>	7,54-7,54	1,0	83	8	110	4	93	12	86	11	29	24	7
<i>Clomazona</i>	7,54-7,60	1,0	86	4	94	4	90	11	85	8	28	20	5
<i>Azinfós-metilo</i>	7,55-7,58	1,0	81	10	100	6	88	6	90	9	31	26	9
<i>Tepraloxidim</i>	7,05-8,09	1,0	78	7	100	5	90	19	89	10	42	22	5
<i>Dimefurón</i>	7,58-7,64	1,0	78	8	109	6	92	9	89	7	24	18	5
<i>Yodosulfurón metilo</i>	7,58-7,64	1,0	92	6	117	6	96	15	96	12	33	24	10
<i>Bensulfurón metilo</i>	7,63-7,63	1,0	71	11	101	6	91	11	88	6	29	16	8
<i>Fenmedifam</i>	7,60-7,66	1,0	74	12	105	6	89	16	87	8	38	20	8
<i>Ioxinil</i>	7,61-7,65	1,0	82	9	106	4	89	17	82	11	39	25	8
<i>Sebutilazina</i>	7,72-7,78	1,0	83	4	87	8	91	18	88	19	39	39	5
<i>Dietofencarb</i>	7,74-7,78	1,0	76	8	97	1	86	11	87	9	29	20	6
<i>Fenpiclonil</i>	7,76-7,80	2,0	83	8	102	3	80	17	84	17	41	35	7
<i>Etofumesato</i>	7,86-7,86	1,0	78	8	99	7	86	11	81	8	30	24	7
<i>Flurtamona</i>	7,88-7,94	1,0	89	4	100	11	91	10	88	10	26	24	5
<i>Dimetenamida</i>	7,91-7,95	1,0	88	6	97	7	90	12	91	8	29	18	6
<i>Linurón</i>	7,93-7,94	1,0	85	9	97	9	88	7	82	7	23	22	7
<i>Triclopir</i>	7,94-7,98	1,0	87	9	95	6	90	16	84	18	36	37	8

Plaguicida*	RTW (min)	Dwell weight (ms)	Repetibilidad (n=8)				Reproducibilidad (n=8)				U		LOQ
			R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	(%) ^a	(%) ^b	RSD (%)
<i>Prosulfurón</i>	7,95-7,99	1,0	72	7	94	9	100	18	98	10	38	22	6
<i>Fenamidona</i>	7,96-8,02	1,0	79	7	107	7	86	14	89	7	33	18	5
<i>Terbutilazina</i>	7,97-8,01	1,0	71	9	90	8	79	14	84	5	37	17	5
<i>Metiocarb</i>	8,04-8,04	1,0	75	9	96	5	83	8	82	11	26	26	8
<i>Etiprol</i>	8,07-8,07	1,0	77	5	102	4	92	13	93	9	31	19	4
<i>Mandipropamid</i>	8,09-8,13	1,0	73	12	103	8	91	15	84	13	36	30	8
<i>Promecarb</i>	8,17-8,17	1,0	77	5	100	4	87	13	87	7	31	18	5
<i>Fluopicolida</i>	8,16-8,20	1,0	80	4	106	3	93	12	95	6	28	13	3
<i>Bentiavalicarbo- isopropilo</i>	8,19-8,20	1,0	88	4	107	8	95	9	90	5	26	15	5
<i>Flutolanil</i>	8,19-8,25	1,0	82	7	107	2	85	15	91	7	35	16	4
<i>Propizamida</i>	8,23-8,29	1,0	86	5	111	5	87	14	87	8	33	20	4
<i>Mepronilo</i>	8,23-8,29	1,0	84	9	111	2	92	15	100	8	34	16	9
<i>Metoxifenoazida</i>	8,24-8,28	1,0	86	7	109	5	93	8	90	5	22	13	4
<i>Molinato</i>	8,28-8,28	1,0	77	9	99	6	89	11	82	9	29	24	7
<i>Flurprimidol</i>	8,25-8,31	1,0	89	7	111	4	95	10	89	8	26	19	7
<i>Triadimefón</i>	8,27-8,33	1,0	92	5	113	4	92	12	87	9	28	20	4
<i>Propetamfos</i>	8,37-8,41	1,0	84	8	113	3	92	15	88	6	33	15	6
<i>Ciprodinilo</i>	8,36-8,42	1,0	70	11	92	8	81	8	76	8	28	26	5
<i>Flurocloridona</i>	8,40-8,46	2,0	97	7	113	5	87	16	88	8	38	20	6
<i>Iprovalicarb</i>	8,42-8,46	1,0	87	3	106	4	89	9	87	7	25	18	2
<i>Triazofos</i>	8,44-8,50	1,0	86	5	115	3	90	16	99	9	37	19	4
<i>Fluopiram</i>	8,49-8,49	1,0	71	8	95	3	98	20	91	5	43	13	2
<i>Bifenazato</i>	8,47-8,51	1,0	90	7	118	5	101	19	96	8	41	17	3
<i>Mepanipirima</i>	8,47-8,51	3,0	77	8	104	5	88	16	88	8	37	19	6
<i>Cromafenoazida</i>	8,53-8,53	1,0	89	10	115	5	90	12	93	6	30	14	2

Plaguicida*	RTW (min)	Dwell weight (ms)	Repetibilidad (n=8)				Reproducibilidad (n=8)				U		LOQ
			R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	(%) ^a	(%) ^b	RSD (%)
<i>Triadimenol</i>	8,50-8,56	3,0	84	7	114	5	94	13	92	9	30	20	6
<i>Fluoxastrobina</i>	8,54-8,55	1,0	85	7	113	4	90	15	95	8	35	17	4
<i>Espirotramat</i>	8,54-8,55	1,0	83	8	113	7	92	9	95	7	25	16	6
<i>Trietazina</i>	8,53-8,59	1,0	73	4	96	4	90	15	85	10	34	23	4
<i>Fluquinconazol</i>	8,54-8,60	1,0	83	11	108	4	98	15	93	12	34	25	8
<i>Cloroxurón</i>	8,54-8,60	1,0	86	7	117	4	90	16	95	12	40	25	6
<i>Diclofluanida</i>	8,55-8,61	2,0	74	6	98	6	81	16	79	8	39	23	4
<i>Petoxamida</i>	8,57-8,63	1,0	84	8	108	7	89	11	94	5	28	14	5
<i>Flufenacet</i>	8,61-8,61	1,0	80	15	106	5	90	15	95	6	36	14	13
<i>Fenhexamida</i>	8,62-8,62	1,0	75	13	105	3	85	15	89	7	37	17	11
<i>Mecarbam</i>	8,63-8,63	1,0	81	5	106	5	87	11	90	8	30	18	2
<i>Napropamida</i>	8,62-8,68	1,0	85	3	107	6	90	11	90	5	27	14	2
<i>Tebutam</i>	8,69-8,69	1,0	80	5	100	3	87	10	99	6	27	12	4
<i>Epoxiconazol</i>	8,70-8,74	1,0	97	7	110	5	92	15	91	19	35	39	5
<i>Metolacoloro</i>	8,75-8,75	1,0	82	4	107	4	88	13	88	8	32	19	4
<i>Protioconazol-destio</i>	8,79-8,80	1,0	97	7	110	5	98	20	93	15	44	30	6
<i>Orizalina</i>	8,80-8,84	1,0	90	5	105	2	91	19	83	8	41	20	6
<i>Bromuconazol</i>	8,66-8,98	1,0	87	6	108	5	97	15	92	12	33	25	6
<i>Ciazofamida</i>	8,83-8,83	1,0	85	4	107	5	93	16	86	12	38	27	4
<i>Rotenona</i>	8,88-8,92	1,0	82	12	108	7	118	9	103	8	24	17	10
<i>Fenbuconazol</i>	8,90-8,91	1,0	93	6	111	4	91	19	89	18	42	37	6
<i>Picoxistrobina</i>	8,90-8,96	1,0	79	8	105	5	93	13	93	9	31	20	5
<i>Flusilazol</i>	8,93-8,97	1,0	92	5	107	4	91	13	83	19	32	39	7
<i>Iprobenfos</i>	8,99-8,99	1,0	99	4	120	3	94	13	95	7	29	15	3
<i>Diflubenzurón</i>	8,97-9,03	1,0	84	10	116	7	86	16	90	9	38	22	8
<i>Espinosad</i>	8,98-9,07	1,0	115	17	110	9	107	14	107	10	41	19	5

Plaguicida*	RTW (min)	Dwell weight (ms)	Repetibilidad (n=8)				Reproducibilidad (n=8)				U		LOQ
			R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	(%) ^a	(%) ^b	RSD (%)
<i>Siltiofam</i>	9,01-9,01	1,0	86	10	112	5	91	14	89	8	33	18	8
<i>Carfentrazona-etilo</i>	9,01-9,07	1,0	77	8	102	4	91	12	94	7	33	15	6
<i>Dimoxistrobina</i>	9,02-9,06	1,0	88	6	104	6	91	10	91	6	26	15	4
<i>Neburón</i>	9,08-9,08	1,0	72	12	107	4	83	16	86	7	39	18	5
<i>Tiazopir</i>	9,06-9,12	1,0	80	9	106	7	87	16	88	9	37	21	9
<i>Diclobutrazol</i>	9,08-9,14	1,0	93	8	109	4	90	16	90	10	37	22	8
<i>Pentiopirad</i>	9,17-9,21	1,0	87	3	111	3	90	11	94	10	27	22	3
<i>Anilfos</i>	9,22-9,23	1,0	84	5	109	4	93	16	93	9	36	19	3
<i>Carpropanid</i>	9,22-9,23	1,0	86	8	111	2	90	14	91	6	34	13	7
<i>Piraflufeno-etilo</i>	9,20-9,26	1,0	84	14	115	6	104	18	89	15	40	31	12
<i>Cumafós</i>	9,25-9,29	1,0	79	6	102	3	88	18	90	14	41	28	5
<i>Haloxifop</i>	9,29-9,30	2,0	83	5	101	5	90	13	81	13	31	29	5
<i>Zoxamida</i>	9,35-9,41	1,0	89	2	113	4	97	13	91	9	29	20	2
<i>Dinoterbo</i>	9,36-9,42	1,0	92	2	106	4	95	16	87	12	35	26	1
<i>Foxim</i>	9,38-9,42	1,0	93	6	110	6	95	17	92	13	37	28	7
<i>Piraclostrobina</i>	9,38-9,42	1,0	91	5	111	3	94	18	92	11	39	23	3
<i>Pinoxaden</i>	9,45-9,49	1,0	74	6	94	3	86	13	97	6	32	14	4
<i>Metconazol</i>	9,49-9,49	1,0	100	7	120	4	105	18	100	18	38	36	8
<i>Triflumurón</i>	9,47-9,51	1,0	84	8	102	5	85	12	88	19	31	39	9
<i>Bixafeno</i>	9,53-9,53	1,0	71	10	112	4	92	19	96	11	42	22	12
<i>Metrafenona</i>	9,56-9,60	1,0	87	6	103	5	91	13	89	11	31	24	5
<i>Pencicurón</i>	9,60-9,64	1,0	85	9	112	7	95	16	95	15	37	31	8
<i>Ametoctradina</i>	9,61-9,67	1,0	86	7	119	4	96	13	94	8	30	18	7
<i>Haloxifop-metilo</i>	9,68-9,72	1,0	82	9	101	4	88	15	87	10	35	23	9
<i>Diniconazol</i>	9,70-9,74	1,0	90	9	109	5	94	16	95	16	35	34	8
<i>Indoxacarbo</i>	9,73-9,77	1,0	98	5	109	4	102	20	88	14	42	30	5

Plaguicida*	RTW (min)	Dwell weight (ms)	Repetibilidad (n=8)				Reproducibilidad (n=8)				U		LOQ
			R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	(%) ^a	(%) ^b	RSD (%)
<i>Triflumizol</i>	9,72-9,78	1,0	74	5	98	4	86	19	84	15	41	32	3
<i>EPN</i>	9,73-9,79	1,0	79	15	116	12	95	20	79	14	44	36	12
<i>Dialato</i>	9,80-9,84	3,0	92	6	104	4	93	15	86	10	34	23	7
<i>Ciflumetofeno</i>	9,94-9,98	1,0	87	5	103	2	87	16	84	18	36	37	3
<i>Fenoxaprop-P-etil</i>	9,99-10,0	1,0	70	2	85	3	85	18	78	17	41	39	3
<i>Quizalofop-etil</i>	10,0-10,0	1,0	82	4	102	3	91	18	87	14	40	29	4
<i>Haloxifop-etoxietilo</i>	9,99-10,0	1,0	79	5	100	3	90	13	87	10	32	22	4
<i>Fluacifop-P-butil</i>	10,0-10,0	1,0	81	7	99	3	88	17	90	14	39	30	5
<i>Amisulbrom</i>	10,0-10,0	2,0	85	12	119	7	96	19	91	13	42	29	9
<i>Tebufenpirad</i>	10,1-10,2	1,0	76	4	104	4	93	13	95	11	29	23	3
<i>Propaquizafop</i>	10,1-10,2	1,0	81	6	102	4	99	15	90	12	33	25	7
<i>Terbufos</i>	10,1-10,2	2,0	91	6	101	3	97	19	83	12	41	27	6
<i>Butóxido de piperonilo</i>	10,2-10,2	1,0	87	4	111	3	94	14	89	9	31	20	4
<i>Bioaletrina</i>	10,3-10,3	3,0	94	4	108	3	94	16	90	13	35	26	4
<i>Fluazinam</i>	10,3-10,3	1,0	85	3	99	4	87	18	80	12	41	29	3
<i>Teflubenzurón</i>	10,4-10,5	1,0	98	9	119	2	80	15	79	17	38	37	10
<i>Quinoxifeno</i>	10,4-10,5	1,0	85	3	99	3	86	18	84	13	41	28	4
<i>Tralkoxidim</i>	10,5-10,5	1,0	84	5	103	4	92	14	87	11	33	24	4
<i>Fosfato de tricresilo</i>	10,5-10,5	2,0	83	6	103	3	88	13	78	18	32	40	6
<i>Hexitiazox</i>	10,5-10,5	3,0	88	3	104	3	90	17	85	19	38	39	4
<i>Trialato</i>	10,5-10,6	1,0	95	6	106	6	92	15	84	15	34	33	6
<i>Espiromesifeno</i>	10,5-10,6	1,0	87	9	110	4	94	18	87	10	40	23	9
<i>Fenpiroximato</i>	10,8-10,8	1,0	88	6	107	7	84	12	82	17	31	38	5
<i>Espirodiclofeno</i>	10,8-10,9	1,0	80	12	108	4	98	14	88	18	32	38	12
<i>Proquinazid</i>	11,0-11,0	1,0	85	3	104	3	94	18	84	10	38	23	3

Plaguicida*	RTW (min)	Dwell weight (ms)	Repetibilidad (n=8)				Reproducibilidad (n=8)				U		LOQ
			R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	R (%) ^a	RSD (%) ^a	R (%) ^b	RSD (%) ^b	(%) ^a	(%) ^b	RSD (%)
<i>Abamectina</i>	11,4-11,4	3,0	95	10	109	5	86	20	96	16	37	12	8

*Rango lineal de 6-167 µg/kg para todos los plaguicidas, excepto para 3-hidroxi-carbofurano de 0,6-16,7 µg/kg; ^a Nivel de fortificación de 6 µg/kg excepto para 3-hidroxi-carbofurano (0,6 µg/kg). ^b Nivel de fortificación de 50 µg/kg excepto para 3-hidroxi-carbofurano (5 µg/kg). Abreviaturas. R: recuperación; U: incertidumbre.

Adicionalmente, se evaluó la inyección de los extractos finales sin dilución y diluidos 5 y 10 veces. Se descartó no aplicar dilución a los extractos: la elevada sensibilidad del UHPLC-MS/MS implicó que algunos plaguicidas saturaran la señal y que provocaran una supresión significativa de la respuesta de otros. Los mejores resultados se obtuvieron diluyendo 10 veces, reduciendo el efecto matriz, y mejorando así la selectividad y robustez. Además, se consiguió una mejora considerable en la forma de pico.

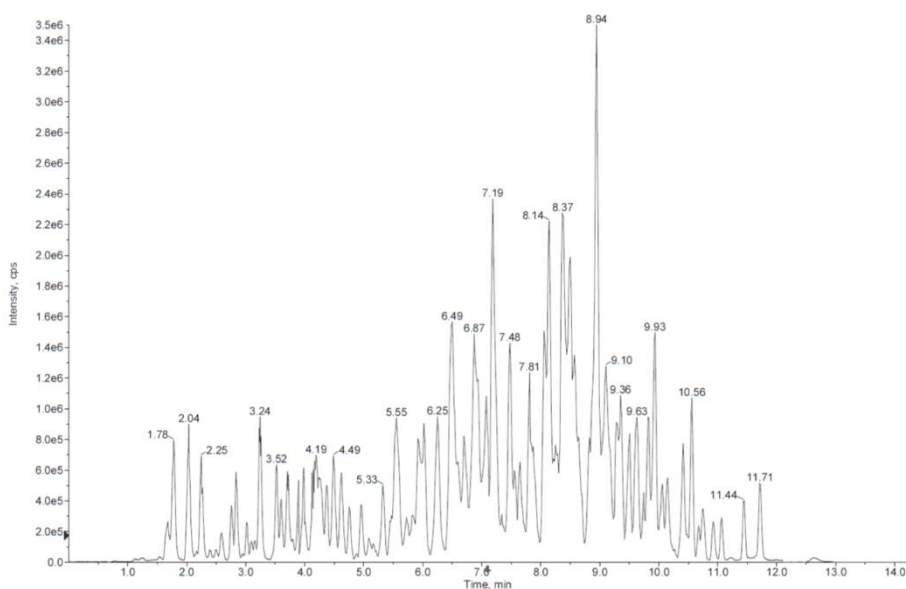


Figura 2.4. Cromatograma total de iones (TIC) de una muestra de puré de fresa fortificada a $6 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Sin embargo, la extracción no resultó completamente efectiva en algunas frutas procesadas más densas y compactas, como los purés concentrados o las mermeladas. Por tanto, en estos casos, el tamaño de muestra se redujo de 10 a 5 g, añadiéndose 10 mL adicionales de agua durante la extracción, lo que permitió obtener mejores resultados.

Con el fin de verificar los resultados y la eficacia de extracción, se añadió un estándar interno subrogado (TPP) durante esta etapa, comprobándose que su recuperación oscilase entre el 60 y el 130%, lo que se considera aceptable tanto por las pautas de la Guía SANTE como la ISO.

3.3.3. Validación de la metodología propuesta

El método desarrollado fue validado para verificar su aplicabilidad en análisis de rutina de muestras y garantizar la fiabilidad de los resultados (**Tabla 2.5**).

En primer lugar, la identificación de los plaguicidas se llevó a cabo basándose en las RTWs (**Tabla 2.5**), tal como se describió previamente (**Sección 3.2.5**). En todos los casos, se cumplió el umbral ($\pm 0,1$) establecido por la guía SANTE (20). La confirmación se realizó mediante la adquisición de dos transiciones de MS/MS, comparando su relación de intensidad (cuantificación y confirmación), y teniendo en cuenta que la proporción relativa entre ambas transiciones debía diferir $\leq 30\%$. La selectividad/especificidad se evaluó extrayendo y analizando purés de fresa que se supiera que estaban libres de plaguicidas, para poder establecer la ausencia de señal al tiempo de elución de los plaguicidas estudiados y, así, demostrar que ni la matriz ni los compuestos presentes en la muestra pudieran dar falsos positivos.

Para solventar el efecto matriz, se inyectó un calibrado en matriz a concentraciones de 6, 10, 50, 100 y 167 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (0,6, 1, 5, 10 y 16,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en el caso del 3-hidroxi-carbofurano). Como respuesta se usó el área de pico, y el método demostró ser lineal con coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0,98 para todos los plaguicidas, con desviación para cada nivel de concentración del calibrado $\leq 20\%$.

La veracidad se evaluó basándose en la recuperación de muestras de blanco fortificadas a dos concentraciones, 6 y 50 µg/kg, como se describió previamente. La **Tabla 2.5** muestra que el funcionamiento del método fue el correcto, con recuperaciones comprendidas en el intervalo de 70-115% a 6 µg/kg y de 74-120% a 50 µg/kg. En el caso del 3-hidroxi-carbofurano, que fue validado a concentraciones inferiores para cumplir con los requerimientos de la legislación actual, se obtuvieron recuperaciones aceptables a 0,6 y 5 µg/kg (74% y 90%, respectivamente).

Los resultados notablemente buenos obtenidos para la precisión, en términos de precisión intra- e inter-día, y expresados como RSD (%), aparecen reflejados en la **Tabla 2.5**. En este caso, se consiguieron valores inferiores o iguales al 20% para los dos niveles de concentración estudiados, lo que indica la fiabilidad del método. Los valores de repetibilidad intra-día se encontraban en el rango de 2-17% y 1-12% a 6 y 50 µg/kg (0,6 y 5 µg/kg para 3-hidroxi-carbofurano), respectivamente. Análogamente, la reproducibilidad inter-día, evaluada tal como se describió previamente, oscilaba entre 3-20% y 4-20%, respectivamente (**Tabla 2.5**).

Focalizado en el análisis en rutina, el LOQ se estableció a 6 µg/kg para todos los compuestos, excepto para 3-hidroxi-carbofurano, que se fijó a 0,6 µg/kg, la concentración más baja que cumple con los requerimientos descritos en la **Sección 3.2.5**. La **Tabla 2.5** muestra los valores de RSD obtenidos. Es preciso señalar que el LOQ establecido cumplió el requisito de ser inferior o igual al LMR establecido por la UE para frutas frescas, haciendo hincapié en el hecho de que la legislación no se refiere específicamente a las frutas procesadas.

La incertidumbre calculada oscilaba entre 19-44% para el valor del LOQ y 12-40% a 50 µg/kg (5 µg/kg en el caso de 3-hidroxi-carbofurano). Finalmente, se obtuvo la evidencia de que el método era apto para el propósito con el que se desarrolló mediante el análisis de otros productos de fruta procesada. Esta información se adquirió tal como se describe a continuación. Inicialmente, para la calibración se seleccionó puré de fresa, en primer lugar, debido a la disponibilidad de muestras de blancos, aunque también se evaluó su validez como matriz representativa para este grupo de frutas procesadas. Los valores de recuperación promedio y de RSD obtenidos en el caso por ejemplo del puré de albaricoque se muestran en la **Tabla 2.6**. Para la mayoría de los plaguicidas, los valores de recuperaciones y RSD obtenidos fueron aceptables (64-130% y 0,3-19%, respectivamente). Sin embargo, un total de 43 plaguicidas (de los 250) no cumplían los requerimientos necesarios cuando se utilizaba un calibrado de puré de fresa. En términos generales, se calcularon recuperaciones superiores a 130% para un rango limitado de compuestos, posiblemente debido a la existencia de un fuerte efecto matriz. Así, para estos 43 plaguicidas, fue necesario utilizar un calibrado de puré de albaricoque a fin de poder obtener valores de RSD (0,04-20%) y recuperación (70-119%) aceptables (**Tabla 2.6**, valores entre paréntesis). Éstos fueron cuantificados usando este calibrado en matriz para asegurar que las muestras reales pudieran ser evaluadas con precisión. La misma metodología de verificación se aplicó para otras frutas procesadas antes de analizar las muestras reales, obteniéndose buenos resultados en todos los casos. Para la mermelada de fresa, se cuantificaron 209 plaguicidas (de 250) utilizando una recta de calibrado de puré de fresa. Análogamente, se usó puré de fresa para calibrar y cuantificar 213 plaguicidas en melocotón en almíbar, 207 en

pulpa de albaricoque, 243 en puré de pera, 239 en puré de melocotón, 236 en puré de manzana, 243 en pulpa de fresa, 248 en puré concentrado de fresa, 245 en puré de arándanos, 241 en puré de arándano concentrado, 247 en puré de frambuesa, 238 en puré de frambuesa concentrado, y 241 en puré concentrado de mora. Sin embargo, del mismo modo que anteriormente, para aquellos plaguicidas que no se cumplían los requerimientos, en su lugar se utilizó recta de la misma matriz analizada.

3.3.4. Análisis de muestras reales

El método validado se aplicó al análisis en rutina de 103 muestras de 15 tipos de productos de frutas procesadas, específicamente: puré (43) y pulpa (2) de fresa, puré concentrado de fresa (13), mermelada de fresa (1), puré (8) y pulpa (5) de albaricoque, puré de arándanos (6), puré de arándanos concentrado (4), puré de frambuesas (7), puré de frambuesas concentrado (6), puré de moras concentrado (1), puré de manzana (2), puré de pera (3), puré de melocotón (1) y melocotón en almíbar (1). Para cada secuencia de muestras, el control de calidad interno se llevó a cabo siguiendo las pautas previamente descritas.

Se detectó la presencia de plaguicidas por encima del LOQ (0,6 µg/kg para 3-hidroxi-carbofurano y 6 µg/kg para los otros compuestos) en el 53% de las muestras analizadas. La **Tabla 2.7** ofrece un resumen de los plaguicidas cuantificados y sus concentraciones estimadas en los productos de frutas procesadas analizados. Los compuestos detectados cumplían los requerimientos de tiempo de retención y relación de iones correctos en comparación con los estándares en matriz inyectados. El plaguicida más comúnmente detectado fue el insecticida espinosad, seguido de cerca por fluopiram, ciprodinilo, piraclostrobina y tiofanato-metilo, que son fungicidas.

Tabla 2.6. Recuperación promedio y valores de RSD calculados mediante inyección de 3 muestras fortificadas de puré de albaricoque con recta de calibrado preparada en puré de fresa.

<i>Plaguicida</i>	<i>R (%)^{a,b}</i>	<i>RSD (%)^b</i>	<i>Plaguicida</i>	<i>R (%)^{a,b}</i>	<i>RSD (%)^b</i>
2,4-D	129	4	Imazapir	91	4
2.6-Diclorobenzamida	111	3	Imidacloprid	127	5
Abamectina	86	2	Indoxacarb	185 (96)	8 (2)
Acefato	88	2	Yodosulfurón-metilo	127	2
Acetamiprid	91	1	Ioxinil	112	3
Ácido acibenzolar	96	2	Iprobenfos	84	2
Adicarb-sulfóxido	88	1	Iprovalicarb	91	1
Aldicarb	76	2	Isoprocab	99	5
Aldicarb-sulfona	113	5	Isoproturón	96	1
Ametoctradina	118	6	Isoxaflutol	101	3
Ametrina	100	1	Lenacilo	95	1
Aminocarb	87	1	Linurón	102	0
Amisulbrom	121	20	Malaoxón	87	1
Anilofos	149 (111)	4 (1)	Mandipropamid	121	3
Atrazina	85	7	Mecarbam	100	1
Atrazina-desetil	92	1	Mepanipirima	122	2
Atrazina-desisopropil	132 (90)	1 (12)	Mepanipirima-2-hidroxipropil	88	4
Azaconazol	104	2	Mepronilo	104	3
Azadiractina	96	19	Mesotriona	127	3
Azinfós-metilo	89	5	Metamitrona	85	2
Bendiocarb	92	3	Metazacloro	96	1
Bensulfurón-metil	101	9	Metconazol	229 (94)	15 (0)
Bentiavalicarbo-isopropilo	102	3	Metabenzthiazurón	92	1
Bifenazato	97	7	Metacrifós	83	2

<i>Plaguicida</i>	<i>R (%)^{a,b}</i>	<i>RSD (%)^b</i>	<i>Plaguicida</i>	<i>R (%)^{a,b}</i>	<i>RSD (%)^b</i>
Bioaletrina	168 (90)	3 (20)	Metiocarb	116	3
Bixafeno	183 (92)	8 (1)	Metiocarb-sulfona	104	5
Bromoxinil	89	9	Metiocarb-sulfóxido	89	4
Bromuconazol	227 (94)	19 (17)	Metomilo	94	6
Butocarboxim	71	5	Metoxifenzida	83	2
Butoxicarboxim	90	2	Metobromurón	97	5
Espirotramat BYI 08330-enol	119	3	Metolaclo	109	4
Espirotramat BYI 08330-enol-glucósido	120	3	Metolcarb	104	5
Espirotramat BYI 08330-ketohidroxi	92	11	Metosulam	112	7
Espirotramat BYI 08330-monohidroxi	89	3	Metoxuron	91	4
Carbaril	97	4	Metrafenona	192 (109)	2 (1)
Carbendazima + Benomilo	64	4	Metribucina	100	11
Carbetamida	80	8	Metsulfurón-metilo	105	3
3-hidroxi-carbofurano	97	1	Molinato	102	19
Carfentrazona-etilo	113	5	Monocrotofós	94	3
Carpropamid	129	6	Monolinurón	110	10
Clorantraniliprol	96	2	Monurón	97	3
Cloridazona	91	2	Napropamida	93	4
Clorotolurón	90	4	Neburón	129	1
Cloroxurón	117	4	Nicosulfurón	99	2
Clorsulfurón	108	12	Nitenpiram	106	3
Cromafenozida	109	2	Ofurace	95	5
Cinosulfurón	103	4	Ometoato	89	1
Climbazol	107	4	Orizalina	174 (100)	6 (0)
Clomazona	112	9	Oxamil	99	1
Clotianidina	120	3	Oxicarboxina	109	2
Cumafós	208 (109)	7 (0)	Oxidemetón- metilo	83	4

<i>Plaguicida</i>	R (%) ^{a,b}	RSD (%) ^b	<i>Plaguicida</i>	R (%) ^{a,b}	RSD (%) ^b
Cianazina	128	2	Pencicurón	206 (100)	7 (2)
Ciazofamida	140 (86)	4 (19)	Penoxsulam	110	6
Ciflumetofeno	115	6	Pentiopirad	128	5
Cimoxanilo	95	3	Petoxamida	92	3
Ciprodinilo	98	13	Fenmedifam	109	4
DEET (N,N-dietil-toluamida)	122	1	Forato-sulfona	103	8
Demetón-S-metilsulfona	94	1	Forato-sulfóxido	129	5
Desmedifam	115	5	Fosfamidón	96	1
Pirimicarb-desmetil	94	1	Foxim	178 (105)	2 (0)
Desmetrina	90	1	Picoxistrobina	130	4
Dialato	124	3	Pinoxaden	104	2
Diclofluanida	128	3	Butóxido de piperonilo	126	1
Diclobutrazol	184 (119)	3 (1)	Pirimicarb	94	3
Dicrotofós	95	2	Promecarb	89	1
Dietofencarb	103	8	Prometrina	105	8
Diflubenzurón	154 (104)	6 (0)	Propamocarb	92	3
Dimefuron	95	7	Propaquizafof	184 (96)	7 (0)
Dimetacloro	96	4	Propetamfos	94	8
Dimetenamida	86	4	Propoxicarbazona	96	18
Dimetoato	84	2	Propizamida	98	4
Dimoxistrobina	89	1	Proquinazid	105	2
Diniconazol	223 (84)	11 (1)	Prosulfurón	110	8
Dinotefuran	92	2	Protioconazol-destio	189 (94)	7 (2)
Dinoterbo	128	1	Piraclostrobina	186 (99)	2 (0)
Disulfotón- sulfóxido	89	5	Piraflufeno-etilo	158 (80)	27 (2)
Disulfotón-sulfona	97	2	Piroxsulam	99	2
Diurón	111	5	Quinclorac	85	2

<i>Plaguicida</i>	<i>R (%)^{a,b}</i>	<i>RSD (%)^b</i>	<i>Plaguicida</i>	<i>R (%)^{a,b}</i>	<i>RSD (%)^b</i>
DMSA	97	6	Quinmerac	85	1
DMST	94	8	Quinoxifeno	117	1
Dodemorf	87	3	Quizalofop-etil	183 (98)	2 (1)
EPN	96 (70)	45 (1)	Rotenona	185 (92)	10 (1)
Epoxiconazol	199 (107)	7 (1)	Sebutilazina	93	1
Etiofencarb	103	6	Siltiofam	105	2
Etiofencarb-sulfona	92	1	Simacina	84	8
Etiofencarb-sulfóxido	88	3	Simetrin	96	2
Etiprol	106	6	Espinosad	73	13
Etirimol	84	2	Espirodiclofeno	70	7
Etofumesato	101	7	Espiromesifeno	110	12
Famofos	111	7	Espirotetramat	97	7
Fenamidona	94	4	Espiroxamina	94	2
Fenbuconazol	284 (104)	9 (2)	Sulcotriona	101	11
Fenhexamida	99	9	Tebufenpirad	182 (102)	3 (0)
Fenoxaprop-P-etil	197 (85)	1 (0)	Tebutam	91	2
Fenpiclonil	248 (91)	5 (1)	Teflubenzurón	208 (120)	12 (11)
Fenpropidina	N/D ^c (104)	N/D ^c (2)	Tepraloxidim	101	14
Fenpropimorfo	96	3	Terbufos	141 (104)	3 (0)
Fenpyroximate	32 (97)	7 (0)	Terbumetón	88	3
Fensulfotión	95	5	Terbumetón desetil	84	4
Fentión sulfóxido	91	4	Terbutilacina	91	7
Flonicamid	129	6	Terbutilacina-desetil	93	4
Fluacifop-P-butil	144 (101)	2 (1)	Tiabendazol	95	2
Fluacinam	66	5	Tiacloprid	101	1
Flufenacet	98	4	Tiametoxam	119	1
Fluometurón	98	3	Tiazopir	121	2

<i>Plaguicida</i>	<i>R</i> <i>(%)^{a,b}</i>	<i>RSD</i> <i>(%)^b</i>	<i>Plaguicida</i>	<i>R</i> <i>(%)^{a,b}</i>	<i>RSD</i> <i>(%)^b</i>
Fluopicolida	99	1	Tifensulfurón-metilo	119	4
Fluopiram	32 (92)	2 (2)	Tiodicarb	101	4
Fluoxastrobina	105	3	Tiofanox sulfona	88	0
Fluquinconazol	155 (82)	12 (2)	Tiofanox-sulfóxido	89	1
Flurocloridona	105	6	Tiofanato-metilo	67	4
Flurprimidol	113	4	Tralkoxidim	97	3
Flurtamona	105	1	Triadimefon	117	1
Flusilazol	173 (101)	29 (0)	Triadimenol	114	10
Flutolanil	109	1	Trialato	127	5
Flutriafol	98	5	Triasulfurón	91	4
Forclorfenurón	125	2	Triazofos	109	1
Formetanato	93	2	Triclorfón	92	0
Fostiazato	96	4	Triclopir	89 (107)	9 (2)
Fuberidazol	95	2	Fosfato de tricresilo	82	10
Haloxifop	146 (88)	10 (1)	Triciclazol	86	6
Haloxifop-etoxietilo	147 (93)	2 (1)	Trietazina	96	3
Haloxifop-metilo	148	1	Triflumizol	172 (97)	8 (0)
Hexitiazox	88	10	Triflumurón	198 (87)	17 (1)
Imazalil	96	8	Vamidotion	87	3
Imazamox	101	1	Zoxamida	139 (92)	5 (0)

R: Recuperación; ^aValor promedio obtenido de la inyección de 5 muestras fortificadas de puré de albaricoque a 6 µg/kg (excepto para 3-hidroxicarbofurano, 0,6 µg/kg); ^b Entre paréntesis, recuperaciones y RSD obtenidos usando una recta de calibrado específica en matriz de puré de albaricoque;; ^cN/D = no disponible.

Tabla 2.7. Plaguicidas detectados, expresados en mg/kg, en las muestras analizadas por encima del LOQ del método analítico.

Plaguicidas detectados (mg/kg)	Tipo de fruta procesada (número de muestras analizadas)									
	Puré concentrado de fresa (13)	Puré de fresa (43)	Pulpa de fresa (2)	Puré de albaricoque (8)	Puré concentrado de arándano (4)	Puré de frambuesa (7)	Puré concentrado de frambuesa (6)	Puré concentrado de mora (1)	Puré de manzana (2)	Puré de pera (3)
Fluopiram	0,038-0,22	0,010-0,18	0,021-0,070						0,006	
Flutriafol	0,013	0,020-0,030								
Ciprodinilo	0,011-0,017	0,013					0,011	0,072		
Triadimenol	0,019									
Fenhexamida	0,011-0,061	0,080								
Imidacloprid				0,016						0,008
Bifenazato		0,011-0,040								
Piraclostrobina					0,018			0,006		0,011
Espinosad	0,013-0,083	0,010-0,049	0,014-0,026			0,038	0,012-0,12	0,19		
Tiofanato-metilo	0,015	0,029-0,048	0,029							
Abamectina	0,011-0,014		0,024							
Tebufenpirad		0,008								
Hexitiazox		0,007						0,010		
Pirimicarb									0,072	
Imazalil										0,86
Tiacloprid							0,016	0,014		

La fresa procesada fue la matriz que presentó un mayor número de positivos, ya que se encontraron residuos de plaguicidas en un 70% de las muestras analizadas, incluso a pesar de que otros estudios hayan sugerido que las cantidades de estos compuestos descienden cuando las frutas se someten a técnicas de procesado ⁽¹⁰⁾. Adicionalmente, se detectaron varios residuos a niveles de traza en puré de fresa, incluyendo espinosad (5 µg/kg), abamectina y ciprodinilo (4 µg/kg), espiromesifeno (2 µg/kg), indoxacarbo (2,4 µg/kg) y etirimol (2,4 µg/kg). Sin embargo, la concentración más elevada se detectó en puré de pera, donde se encontró imazalil, un fungicida de amplio espectro ampliamente usado en post-cosecha, a una concentración de 0,86 mg/kg. Por el contrario, no se detectaron plaguicidas en puré de frambuesa, mermelada de fresa, puré de melocotón o melocotón en almíbar. La **Figura 2.5** muestra algunos ejemplos de resultados positivos de fluopiram (0,18 mg/kg), fenhexamida (0,080 mg/kg), y trazas de piraclostrobina (0,0027 mg/kg) en puré de fresa. Ambas transiciones (la de cuantificación al lado izquierdo y la de confirmación a la derecha) se usaron para identificar y confirmar cada plaguicida detectado.

En un trabajo publicado por *Sannino y col.* ⁽¹⁷⁾, en el que se analizaron 24 plaguicidas en 102 muestras de purés de fruta utilizando un método LC-MS de 20 min de tiempo total, los autores concluyeron que ninguna de las muestras contenían residuos superiores a 0,010 mg/kg. Un estudio más reciente llevado a cabo por *Reichert y col.* ⁽¹¹⁾, que evaluaba la presencia de 107 plaguicidas mediante LC de micro flujo- MS/MS en 51 muestras de mermelada de fruta, sugirió que las muestras más contaminadas eran los productos derivados de fresas, detectando la presencia de plaguicidas en el 80% de las mermeladas analizadas. En particular, las mermeladas de fresa procedentes de España, contenían

penconazol y espinosina A, aunque a concentraciones inferiores que los límites informados (9 y 45 $\mu\text{g}/\text{kg}$), mientras que, en muestras de Brasil (11), encontraron varios plaguicidas, tales como tiofanato-metilo ($> 0,96$ mg/kg) o imidacloprid (0,010-0,067 mg/kg); estos dos compuestos han sido también detectados en algunas de las muestras reales analizadas en nuestro estudio. Finalmente, Reichert y col. (11) encontraron imidacloprid en mermelada de albaricoque (0,009-0,011 mg/kg), confirmándose en nuestro estudio también su presencia en puré de albaricoque (0,016 mg/kg).

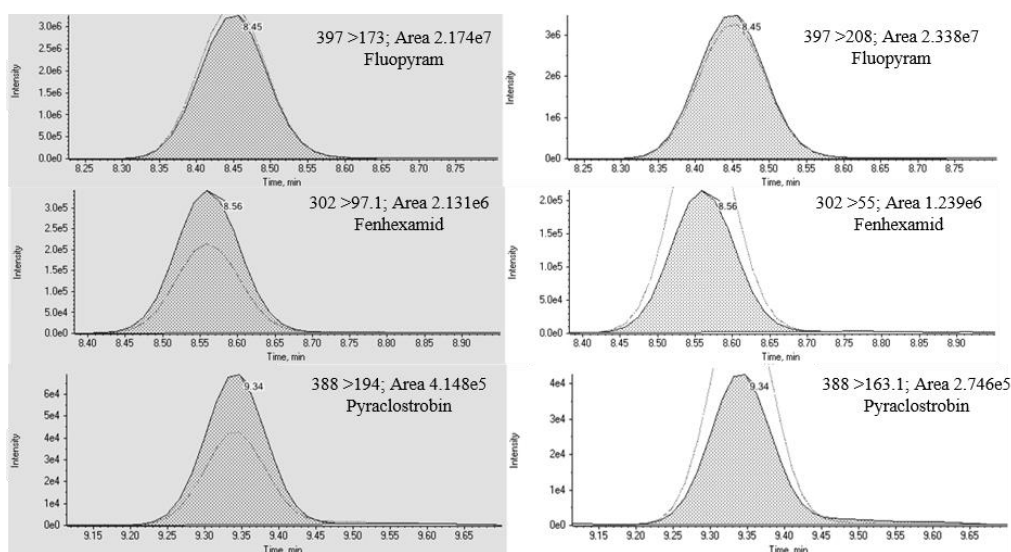


Figura 2.5. Ejemplos de cromatogramas de positivos detectados en puré de fresa: fluopiram (0,18 mg/kg), fenhexamida (0,080 mg/kg) y piraclostrobina a niveles de trazas (0,0027 mg kg^{-1}).

Es importante destacar que, usando el método optimizado para frutas procesadas, los plaguicidas pueden ser detectados a concentraciones inferiores a los LMRs establecidos para fruta fresca, así como el hecho de que estos plaguicidas permanecen en dicha fruta después del procesado, lo que puede contribuir a la ingesta diaria de estos compuestos por parte de los humanos. Por tanto, el presente estudio ha

demostrado la necesidad de métodos para el control de la presencia de estos residuos en frutas procesadas y de reconsiderar los riesgos para la salud basados en todos los productos alimenticios, y no solo en los relacionados con el consumo de frutas frescas.

3.4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado y validado completamente un método analítico multiresiduo rápido y sensible, de acuerdo con la guía europea SANTE, para la determinación de 250 plaguicidas en fruta procesada usando UHPLC-MS/MS. Para extraer las muestras se empleó un método QuEChERS modificado, sin aplicar limpieza al extracto de muestra, lo que contribuyó a potenciar la utilidad del método para el análisis en rutina. La aplicación de una etapa final de dilución minimizó el efecto de la matriz y de posibles interferentes. Se evaluaron varios parámetros de validación (linealidad, selectividad, veracidad, exactitud, precisión, LOQs e incertidumbre), obteniéndose resultados adecuados para todos los plaguicidas analizados. Adicionalmente, se sometió a evaluación la aplicabilidad del método a distintas frutas procesadas de la misma categoría alimentaria mediante estudios de recuperación y repetibilidad. Posteriormente, se analizaron 103 muestras reales, detectándose varios plaguicidas por encima de 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, así como a niveles de traza, y destacando la necesidad de una monitorización más exhaustiva de estos residuos en productos derivados de fruta a fin de proteger la salud humana. En el estudio se incluyeron, además, algunos plaguicidas permitidos en el cultivo ecológico, tales como espinosad o azadiractina.

3.5. REFERENCIAS

- ¹ FAO. (1995). *FAO Agricultural Services Bulletin No 119. Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Available from: <http://www.fao.org/docrep/v5030E/V5030E00.htm#Contents>. Accessed December 2018.
- ² Kaushik, G., Satya, S., & Naik, S. N. *Food processing a tool to pesticide residue dissipation –A review*, *Food Research International*, 42 (2009) 26–40.
- ³ Sumonsiri, N., & Barringer, S. A. (2014). *Chapter 16: Fruits and vegetables– Processing technologies and applications* (pp. 363–381). John Wiley & Sons (Eds.). *Food Processing: Principles and Applications: Second Edition*.
- ⁴ EU Pesticides Database. (2018). <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticidesdatabase/public/?event=homepage&language=EN>. Accessed December 2018.
- ⁵ Picó, Y., Font, G., Ruiz, M. J., & Fernández, M., *Control of pesticide residues by liquid chromatography-mass spectrometry to ensure food safety*, *Mass Spectrometry Reviews*, 25 (2006) 917–960.
- ⁶ Ravelo-Pérez, L. M., Hernández-Borges, J., & Rodríguez-Delgado, M. A., *Multiwalled carbon nanotubes as efficient solid-phase extraction materials of organophosphorous pesticides from apple, grape, orange and pineapple fruit juices*, *Journal of Chromatography A*, 1211 (2008) 33–42.
- ⁷ *Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009, concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC*, *Official Journal of the European Union*, L 309/1–50.
- ⁸ Picó, Y., & Kozmutza, C., *Evaluation of pesticide residue in grape juices and the effect of natural antioxidants on their degradation rate*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389 (2007) 1805–1814.
- ⁹ EFSA, European Food Safety Authority, *The 2016 European Union report on pesticides residues in food*, *EFSA Journal*, 16 (7) (2018) 5348. Available on: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2018.5348> (accessed December 2018).
- ¹⁰ Keikotlhaile, B. M., Spanoghe, P., & Steurbaut, W., *Effects of food processing on pesticide residues in fruits and vegetables: A meta-analysis approach*, *Food and Chemical Toxicology*, 48 (2010) 1–6.
- ¹¹ Reichert, B., Pizzutti, I. R., Costabeber, I. H., Uclés, A., Herrera, S., & Fernández-Alba, A. R., *Validation and application of micro flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of pesticide residues in fruit jams*, *Talanta*, 134 (2015) 415–424.
- ¹² Rizzetti, T. M., Kemmerich, M., Martins, M. L., Prestes, O. D., Adaime, M. B., & Zanella, R., *Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC-MS/MS*, *Food Chemistry*, 196 (2016) 25–33.
- ¹³ Romero-González, R., Frenich, A. G., & Vidal, J. L. M., *Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*, *Talanta*, 79 (2008) 211–225.

- ¹⁴ Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC, Official Journal of the European Union, L 70/1–16.
- ¹⁵ Ferrer, C., Martínez-Bueno, M. J., Lozano, A., & Fernández-Alba, A. R., *Pesticide residue analysis of fruit juices by LC-MS/MS direct injection. One year pilot survey*, *Talanta*, 83 (2011) 1552–1561.
- ¹⁶ Lehotay, S. J., Maštovská, K., & Lightfield, A. R., *Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables*, *Journal of AOAC International*, 88 (2005) 615–629.
- ¹⁷ Sannino, A., Bolzoni, L., & Bandini, M., *Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables*, *Journal of Chromatography A*, 1036, (2004) 161–169.
- ¹⁸ Sannino, A., & Bandini, M., *Determination of seven benzoylphenylurea insecticides in processed fruit and vegetables using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19 (2005) 2729–2733.
- ¹⁹ Fernandes, V. C., Domingues, V. F., Mateus, N., & Deleue-Matos, C., *Analysing organochlorine pesticides in strawberry jams using GC-ECD, GC-MS/MS and QuEChERS sample preparation*, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29 (2012) 1074–1084.
- ²⁰ SANTE/11813/2017. *Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues and analysis in food and feed*, European Commission, Directorate General for Health and Food Safety. Implemented by January 2018.
- ²¹ Lehotay, S. J., De Kok, A., & Van Bodegraven, P., *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.
- ²² EURACHEM. <https://www.eurachem.org> (Accessed December 2018).
- ²³ Rodríguez, L. C., Torres, M. E. H., López, E. A., González, F. J. E., Arrebola, F. J., & Martínez-Vidal, J. L., *Assessment of uncertainty in pesticide multiresidue analytical methods: Main sources and estimation*, *Analytica Chimica Acta*, 454 (2002) 297–314.
- ²⁴ Council Directive 2001/113/EC of 20 December 2001 relating to fruit jams, jellies and marmalades and sweetened chestnut purée intended for human consumption, Official Journal of the European Union, L 10/67-72.

*Condiciones de detección de los plaguicidas
analizados en fruta procesada*

Plaguicida	Ion precursor (m/z)	Ion producto 1 (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)	Ion precursor (m/z)	Ion producto 2 (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
2,6-diclorobenzamida	190,0	173,0	106	10	27	12	190,0	144,9	106	10	39	16
3-hidroxi-carbofurano	238,1	181,0	81	10	15	14	238,1	163,0	81	10	19	14
Avermectina B1a	890,5	305,1	46	10	33	22	890,5	567,3	46	10	19	24
Avermectina B1b	876,5	291,1	61	10	31	14	876,5	145,2	21	10	37	20
Acetamiprid	223,0	126,0	21	10	29	14	223,0	56,0	21	10	21	8
Aldicarb	208,1	116,0	51	2	11	3	208,1	88,9	51	2	20	3
Aldicarb-sulfona	223,0	76,0	96	10	11	8	223,0	85,9	96	10	21	10
Aldicarb-sulfóxido	207,0	89,0	81	10	19	10	207,0	132,0	81	10	9	12
Azaconazol	299,96	159,0	86	10	50	16	299,96	231,0	86	10	23	16
Azadiractina	703,3	567,1	161	10	19	22	703,3	585,1	161	10	19	24
Bendiocarb	224,1	109,1	61	9,5	23	4	224,1	167,2	61	9,5	13	4

Bentiavalicarbo- isopropilo	382,2	180,1	82	10	46	4	382,2	116,1	82	10	32	4
Bifenazato	301,0	198	96	10	13	18	301,0	170,1	96	10	27	14
Bioaletrina	303,0	93,1	86	10	19	8	303,0	107,1	86	10	29	10
Bromuconazol	378,0	159,0	86	10,5	37	4	378,0	160,9	86	10,5	41	4
Butocarboxim	208,1	116,0	26	10	11	8	208,1	59,1	26	10	71	10
Butoxicarboxim	222,99	106,0	56	10	13	12	222,99	166,0	56	10	11	14
Butóxido de piperonilo	356,1	177,0	171	10	35	14	356,1	119,0	171	10	49	8
Carbaril	202,1	127,1	71	10	39	3	202,1	144,9	51	10	15	6,5
Carbendazina + Benomilo	192,2	160,2	51	10	40	12	192,2	132,1	51	10	41	4
Ciazofamida	324,99	108,1	36	10	19	12	324,99	261,1	36	10	13	14
Cimoxanilo	199,0	128,0	71	10	13	12	199,0	111,0	71	10	25	12
Ciprodinilo	226,1	108,0	86	10	35	12	226,1	93,0	86	10	45	10
Clorraniliprol	481,9	283,9	71	10	19	16	483,9	452,8	71	10	25	22

Cloridazona	222,0	104,0	11	10	31	6	222,0	92,2	79	10	35	6,5
Clotianidina	249,9	131,9	51	10	21	10	249,9	169,0	51	10	19	10
Cumafós	363,0	227,0	84	12	35	6,5	363,0	307,0	96	9	23	6,5
DMSA	201,1	91,9	69	10	22,7	16	201,1	137,2	69	10	13,4	16
DEET	192,1	91,0	7	10	47	4	192,1	119,1	7	10	29	4
Demetón-S-metilsulfona	262,96	169,0	41	10	21	14	262,96	109,0	41	10	39	12
Desmedifam	318,0	136,0	56	10	43	6	318,1	182,2	64	10	34	6,5
Desmetrina	214,1	172,0	85	10	30	14	214,1	82,1	85	10	41	10
Diclobutrazol	328,1	70,1	76	10,5	39	4	328,1	159,1	76	10,5	49	4
Diclofluanida	349,9	223,9	36	10	19	20	349,9	123,1	36	10	37	16
Dicrotofós	238,0	112,0	66	10	17	6,5	238,1	127,1	56	9,5	23	6,5
Dietofencarb	268,1	226,0	41	10	13	14	268,1	124,0	41	10	43	14
Diflubenzurón	311,0	158,0	66	8	19	4	311,0	141,2	66	8	47	4
Dimetoato	230,0	199,1	61	7,5	13	4	230,0	125,0	61	7,5	29	4

Diniconazol	326,0	70,0	74	10,5	45	4	328,1	70,1	106	10	31	12
Disulfotón sulfona	306,97	96,9	26	10	46	12	306,97	125,0	26	10	23	8
Disulfotón sulfóxido	290,9	96,9	21	10	62	12	290,9	184,9	21	10	29	18
Diurón	233,0	72,0	86	11	31	4	233,0	160,2	86	11	33	4
DMST	215,0	106,0	21	10	21	12	215,0	79,0	21	10	39	10
Epoxiconazol	329,99	101,0	46	10	65	12	329,99	121,0	46	10	27	10
Espirodiclofeno	411,0	313,0	41	10	17	10	411,0	71,1	41	10	31	8
Espiromesifeno	371,1	273,1	56	10	17	16	371,1	255,1	56	10	31	16
Espirotetramat	374,1	216,0	21	10	45	20	374,1	302,1	21	10	23	16
Espiroxamina	298,3	144,1	21	10	30	10	298,3	100,0	21	10	41	10
Etiofencarb	226,1	107,2	61	9,5	21	6,5	226,1	164,1	61	10	11	3
Etiofencarb-sulfona	275,3	106,9	56	10	29	6,5	275,0	201,1	56	10	17	4
Etiofencarb-sulfóxido	242,0	107,0	16	10	23	12	242,0	185,1	16	10	11	12
Etiprol	397,0	350,9	81	8,5	25	6	397,0	255,1	81	8,5	45	4
Etirimol	210,2	98,1	86	12	37	6,5	210,2	140,0	91	10	31	6

Etofumesato	304,1	121,1	64	11	27	6,5	304,1	161,0	51	10	31	6
Fenamidona	312,1	92,2	84	12	33	6,5	312,1	65,0	81	10	71	4
Fenbuconazol	337,1	125,1	81	4	37	4	337,1	70,0	81	4	35	4
Fenhexamida	302,0	97,1	136	10	31	10	302,0	55,0	136	10	57	26
Fenmedifam	318,1	168,0	56	10	25	14	300,98	168,0	71	10	13	14
Fenpiroximato	422,0	366,1	76	6	23	6	422,0	107,1	76	6	75	4
Fenpropidina	274,2	147,1	106	10	37	10	274,2	117,1	106	10	73	14
Fenpropimorfo	304,1	147,1	56	10	39	6	304,1	117,1	56	10	79	20
Fensulfotión	308,97	280,9	71	10	22	20	308,97	157,0	71	10	33	12
Fention sulfóxido	294,97	279,9	96	10	28	24	294,97	109,0	96	10	43	14
Flonicamid	229,995	203,0	21	10	23	12	229,995	148,0	21	10	37	10
Fluacifop-butil	384,1	282,1	89	9	27	6,5	384,0	328,0	86	10	23	12
Fluopicolida	383,0	172,9	71	10	31	14	383,0	144,9	71	10	69	12
Fluquinconazol	376,0	307,1	94	9	33	6,5	376,0	349,0	91	10	25	14
Flurocloridona	312,0	291,9	101	10	38	24	312,0	145,0	101	10	67	14

Flusilazol	316,1	165,1	76	10	39	4	316,1	247,1	76	10	28	4
Flutolanil	324,1	262,1	89	10	23	4	324,1	242,2	89	10	31	4
Flutriafol	302,1	70,0	36	10	21	10	302,1	122,9	36	10	37	12
Forclorfenurón	248,2	129,1	9	10	24	4	248,0	93,1	9	10	48	4
Formetanato	222,1	165,1	61	12	19	6,5	222,0	120,0	76	5	37	6,5
Fosfamidón	299,9	174,0	41	10	19	12	299,9	127,0	41	10	33	16
Fosfato de tricresilo	369,0	166,2	171	10	39	12	369,0	91,1	171	10	53	14
Fostiazato	284,0	104,0	11	10	27	6	284,0	228,0	11	10	15	8
Haloxifop-etoxietilo	434,1	315,9	11	12	25	6,5	434,0	288,0	121	10	35	10
Haloxifop-metilo	376,0	316,0	131	10	30	12	376,0	288,0	126	10	33	10
Haloxifop	361,9	316,0	56	10	25	18	361,9	91,1	56	10	37	10
Hexitiazox	353,1	228,0	81	12	21	4	353,1	168,1	76	12	37	4
Imazalil	299,1	160,9	106	10	31	10	299,1	202,9	106	10	25	12
Imazamox	306,1	261,1	71	10	27	28	306,1	245,9	71	10	31	26
Imidacloprid	256,1	209,0	89	7	23	4	256,1	175,0	89	7	25	4

Indoxacarbo	528,1	203,0	96	10	51	6,5	528,1	56,0	96	10	55	4
Iprovalicarb	321,2	119,0	89	12	23	6,5	321,2	203,2	61	10	12	2
Lenacilo	235,1	153,1	74	6,5	21	4	235,1	136,2	74	6,5	43	4
Linurón	249,0	182,1	89	11	21	4	249,0	159,9	89	11	23	4
Malaoxón	315,0	127,1	71	10,5	17	6,5	315,0	99,0	71	10	31	4
Mandipropamid	412,1	125,1	8	10	60	4	412,1	328,1	8	10	35	4
Mecarbam	329,99	227,0	76	10	13	16	329,99	97,0	76	10	53	12
Mepanipirima	224,1	106,0	66	10	35	6	224,1	77,0	66	12	49	6,5
Mepanipirima-2-hidroxiopropil	244,1	226,1	46	10	31	14	244,1	200,1	46	10	25	16
Mepronilo	270,1	119,0	86	10	31	8	270,1	91,0	86	10	59	10
Metiocarb	226,1	169,2	81	9	13	4	226,1	121,0	81	9	23	4
Metiocarb-sulfona	258,1	122,1	68	10	25	3	258,1	201,2	68	10	13	2
Metiocarb sulfóxido	242,0	122,1	26	10	39	8	242,0	185,0	26	10	30	12
Metomilo	163,1	88,1	81	7	13	4	163,1	106,0	81	7	13	4

Metrafenona	408,99	209,1	16	10	19	16	408,99	227,0	16	10	29	16
Metoxifenoza	369,1	149,1	81	10	38	10	369,1	313,1	81	10	11	16
Metribucina	215,1	84,1	75	7	29	4	215,1	187,2	75	7	30	4
Monocrotofos	224,1	127,0	86	11,5	21	6,5	224,0	98,0	86	10	17	4
Nitenpiram	271,1	126,1	79	8,5	39	4	271,1	225,1	79	8,5	15	4
Ofurace	282,1	254,0	84	10,5	17	6,5	282,0	160,0	86	10	29	6
Ometoato	213,96	125,0	21	10	29	8	213,96	183,0	21	10	15	12
Oxamil	237,1	72,0	63	5,5	25	6,5	237,1	90,1	63	4	11	3
Oxidemetón-metilo	246,95	169,0	46	10	19	14	246,95	109,0	46	10	37	12
Pencicurón	329,0	125,0	46	10	45	10	329,0	218,0	46	10	21	12
Piraclostrobina	388,0	194,0	56	10	17	16	388,0	163,1	56	10	33	12
Pirimicarb	239,1	72,1	56	7	35	6,5	239,2	182,2	73	10	21	2
Pirimicarb desmetil	224,999	72,0	26	10	31	10	224,999	168,1	26	10	19	10
Promecarb	208,1	109,1	61	9,5	23	4	208,1	151,1	61	9,5	13	4
Prometrina	242,1	200,1	91	10	19	4	242,1	158,1	91	10	45	4

Propamocarb	189,2	102,0	56	10	23	6,5	189,2	73,9	71	10	35	3
Propizamida	255,9	189,9	41	10	19	12	255,9	173,0	41	10	31	12
Proquinazid	372,98	215,9	56	10	65	18	372,98	271,9	56	10	47	12
Quinoxifeno	308,0	162,0	61	10	57	7	307,9	162,0	61	12	57	6,5
Quizalofop-etil	373,1	298,9	94	11,5	28	6,5	373,0	271,0	116	10	33	10
Rotenona	395,1	213,0	96	9,5	29	4	395,1	192,1	96	9,5	31	4
Simacina	202,1	132,1	86	4,5	25	4	202,1	124,3	86	4,5	25	4
Espinosina A	733,2	142,0	51	10	35	10	732,3	98,1	121	10	95	16
Espinosina D	746,3	142,2	96	10	37	10	746,4	98,0	46	10	103	14
Tebufenpirad	334,0	145,0	91	10	37	6	334,2	117,0	71	10,5	47	6,5
Terbufos	289,0	103,0	41	10	13	8	289,0	57,0	41	10	33	10
Terbutilacina	230,1	174,1	81	11,5	35	6,5	230,1	104,1	86	7,5	41	4
Tiabendazol	202,0	175,1	79	5	35	4	202,0	131,1	79	5	43	4
Tiacloprid	252,95	126,0	46	10	29	10	252,95	186,0	46	10	19	14
Tiametoxam	292,0	211,0	74	8,5	17	6,5	292,0	181,0	96	10	31	7

Tiodicarb	354,98	88,0	81	10	21	10	354,98	108,0	81	10	19	10
Tiofanox sulfona	268,1	76,0	61	10	15	10	268,1	57,0	61	10	23	8
Tiofanox-sulfóxido	252,1	104,0	56	9,5	17	6,5	235,1	104,0	57	9,5	15	6,5
Tiofanato-metilo	343,0	151,0	46	10	25	22	343,0	118,2	46	10	69	14
Triadimefón	294,1	197,0	41	10	21	12	294,1	69,0	41	10	27	10
Triadimenol	296,0	70,0	36	10	39	10	296,0	99,1	36	10	21	8
Triazofos	314,0	162,0	76	2	30	6,5	314,0	119,1	71	12	47	6,5
Triclorfón	273,9	108,9	36	10	29	12	273,9	220,9	36	10	21	14
Triflumizol	346,0	278,0	56	7	17	4	346,0	72,9	56	7	23	4
Triflumurón	359,1	156,2	71	10	23	4	359,1	139,0	71	10	43	4
Vamidotion	288,0	145,9	56	8	17	6,5	288,0	118,0	56	10	31	6
Zoxamida	336,0	187,0	86	10	30	4	338,1	188,7	86	10	31	4
Ametoctradina	276,0	176,1	46	10	49	12	276,0	149,1	46	10	49	12
Ametrina	228,1	186,2	76	11	25	6,5	228,2	96,1	86	4,5	33	4
Aminocarb	209,1	152,1	56	8,5	19	6,5	209,2	137,1	7	10	32	3

Amisulbrom	465,8	226,9	86	10	25	16	465,8	148,0	86	10	65	10
Anilofos	367,9	198,9	36	10	19	14	367,9	125,0	36	10	43	12
Atrazina	215,9	174,1	81	10	25	12	215,9	103,9	81	10	39	12
Atrazina-desetil	188,0	146,0	81	10	23	10	188,0	103,9	81	10	35	12
Atrazina-desisopropil	174,0	104,0	56	10	31	12	174,0	96,0	56	10	25	10
Bensulfuron-metil	411,1	148,9	86	10	27	6,5	411,1	119,0	81	10	51	6
Bixafeno	413,9	394,0	116	10	19	20	413,9	266,0	116	10	33	14
Carpropamid	333,99	139,0	131	10	27	12	333,99	103,0	131	10	55	12
Carbetamida	237,1	118,1	64	7	19	6,5	237,1	192,0	66	10	13	7
Carfentrazona-etilo	412,0	346,1	85	10	27	6	412,0	366,1	85	10	25	6
Cloroxurón	291,1	72,0	89	10	41	6,5	291,1	218,0	89	10	41	6,5
Clorotolurón	213,1	72,2	81	6	31	4	213,1	46,2	81	6	27	4
Clorsulfurón	358,0	141,0	71	10	23	6,5	358,0	167,0	91	10	25	7
Cromafenozida	395,1	175,1	56	10	21	12	395,1	339,0	56	10	11	16
Ciflumetofeno	465,1	173,0	86	10	31	10	465,1	249,0	86	10	19	12

Cinosulfurón	414,1	182,9	74	10	23	6,5	414,1	215,0	71	10	21	7
Climbazol	293,0	197,0	51	10	23	16	293,0	69,0	51	10	27	8
Clomazona	240,1	125,0	66	12	30	6,5	240,0	89,0	66	10	65	4
Cianazina	241,1	214,1	79	12	23	6,5	241,2	104,1	81	8	39	4
Dialato	270,0	86,0	41	10	21	10	270,0	128,1	41	10	17	10
Dimefurón	339,1	167,0	81	11,5	29	6,5	339,1	256,0	81	10	21	10
Dimetacloro	256,1	224,2	64	10,5	19	6,5	256,1	148,0	64	10	33	6
Dimetenamida	276,1	244,1	66	4,5	17	4	276,1	168,3	66	4,5	33	4
Dimoxistrobina	327,0	205,0	41	10	15	18	327,0	116,0	41	10	31	14
Dinotefuran	203,0	157,1	31	10	11	14	203,0	129,1	31	10	15	6,5
Dodemorf	282,3	116,1	89	12	29	12	282,3	98,0	89	10	39	4
EPN	324,0	296,0	76	8	19	6	324,0	156,9	86	10	29	6,5
Famofos	325,99	280,9	61	10	19	14	325,99	217,0	61	10	27	14
Fenoxaprop-P-etil	361,99	288,0	126	10	25	18	361,99	119,0	126	10	35	8
Fenpiclonil	253,9	202,1	55	10	35	6,5	253,9	140,0	55	10	57	6

Flufenacet	364,1	152,2	61	7	25	4	364,1	194,2	61	7	17	4
Fluopiram	396,979	173	71	10	39	10	396,979	208	71	10	29	14
Fluometurón	233,1	72,0	76	11	37	4	233,1	145,2	76	11	45	4
Fluoxastrobina	459,1	427,1	76	8,5	35	6	459,1	188,1	76	8,5	41	4
Flurtamona	334,1	247,1	84	11	35	6,5	334,1	178,0	76	10	57	7
Foxim	298,9	77,1	101	10	45	10	298,9	129,0	101	10	17	12
Flurprimidol	313,0	270,0	66	10	33	16	313,0	269,0	66	10	47	18
Fuberidazol	185,1	157,1	66	11,5	31	6,5	185	65	66	10	59	4
Imazapir	262,1	149,2	75	7	35	4	262,1	217,1	75	7	37	4
Yodosulfurón metilo	507,9	167,2	79	9	27	6,5	508,0	141,0	81	10	35	6
Iprobenfos	288,999	205,0	56	10	15	14	288,999	91,1	56	10	31	10
Isoprocab	194,1	95,0	51	10	19	12	194,1	137,0	51	10	13	14
Isoproturón	207,2	72,1	86	4	29	4	207,1	165,2	86	10,5	19	6,5
Isoxaflutol	360,1	251,0	66	10	23	16	360,1	220,0	66	10	53	14
Mesotriona	357,1	228,0	56	7	29	6,5	339,9	104,0	126	10	41	12

Metamitrona	203,0	104,0	61	10	31	12	203,0	175,0	61	10	23	36
Metazacloro	277,9	134,1	31	10	29	12	277,9	210,0	31	10	15	12
Metabenzotiazurón	222,2	165,1	71	4	23	4	222,1	150,3	71	4	41	4
Metacrifós	257,9	209,0	66	10	17	16	257,9	125,0	66	10	31	12
Metobromurón	259,0	170,0	76	8,5	28	6,5	259,0	148,2	76	7,5	21	4
Metolacloro	284,1	176,2	54	4,5	33	4	284,1	251,9	54	4,5	19	4
Metolcarb	166,1	109,1	61	9,5	17	4	166,1	94,2	61	9,5	37	4
Metosulam	418,0	175,1	76	10,5	27	6,5	418,0	140,0	86	10	69	6
Metoxuron	229,0	72,1	69	9,5	35	4	229,0	156,1	69	9,5	31	4
Metsulfurón metilo	382,0	167,0	76	10	21	6	382,1	198,9	74	10,5	27	6,5
Molinato	188,0	126,1	51	10	19	14	188,0	98,0	51	10	25	12
Metconazol	320,1	70,0	51	10	55	8	320,1	125,0	51	10	55	10
Monolinurón	215,1	125,9	79	9	30	4	215,1	99,0	79	9	43	4
Monurón	199,1	72,0	69	11	29	4	199,1	125,9	69	11	33	4
Napropamida	272,1	129,3	71	11,5	21	6,5	272,0	171,0	71	10	23	7

Neburón	274,96	88,1	81	10	21	10	274,96	114,0	81	10	21	10
Nicosulfurón	411,1	182,1	81	9	25	6,5	411,1	213,0	11	10	23	7
Oxicarboxina	268,0	175,1	76	11,5	19	6,5	268,0	147,0	76	10	29	6
Penoxsulam	484,1	195,2	18	10	38	4	484,1	194,2	18	10	51	4
Petoxamida	296,1	131,1	36	10	27	12	296,1	250,1	36	10	17	14
Pentopirad	360,1	256,0	61	10	29	16	360,1	236,0	61	10	41	14
Forato-sulfona	293,0	171,1	76	10	15	4	293,0	97,0	76	10	51	4
Forato-sulfóxido	277,0	97,0	71	11	43	4	277,0	199,1	71	11	15	4
Picoxistrobina	368,1	145,0	79	6,5	27	6,5	368,0	205,0	81	10	15	7
Pinoxaden	401,1	317,1	36	10	35	18	401,1	57,1	36	10	59	10
Propaquizafop	443,9	100,1	26	10	23	10	443,9	371,0	26	10	21	12
Propetamfos	282,1	138,0	76	10	21	6	282,1	156,2	74	10	17	6,5
Prosulfurón	420,1	141,1	79	9	27	6,5	420,1	167,0	11	10	25	7
Protioconazol-destio	311,97	70,0	71	10	27	10	311,97	125,0	71	10	47	14
Piroxsulam	435,0	195,2	86	10	39	4	435	194,1	86	10	55	4

Piraflufeno-etilo	412,5	338,9	26	10	37	14	412,5	252,9	26	10	45	20
Quinmerac	222,0	204,1	64	10	23	6,5	222,0	141,0	66	10	43	6
Quinlorac	241,9	223,9	26	10	21	16	241,9	161,0	26	10	51	10
Sebutilazina	230,1	174,2	66	11,5	25	6,5	230,0	131,9	81	10	33	12
Simetrin	214,1	124,2	74	10,5	27	6,5	214,0	144,0	76	10	27	6
Siltiofam	268,1	139,0	51	10	25	12	268,1	73,0	51	10	39	8
Sulcotriona	328,9	139,1	111	10	25	10	328,9	111,1	111	10	37	8
Terbumetón	226,1	170,2	56	11,5	23	6,5	226,0	114,0	56	10	35	6
Terbumetón desetil	198,1	142,0	61	10	28	12	198,1	100,0	61	10	31	14
Terbutilacina-desetil	202,0	145,9	61	10	23	10	202,0	104,0	61	10	37	12
Tebutam	234,2	91,0	61	10,5	35	6,5	234,0	192,0	61	10	19	7
Tepraloxidim	342,0	250,0	71	10	19	14	342,0	166,0	71	10	29	12
Tifensulfurón-metilo	388,0	167,0	69	9	21	6,5	388,0	205,0	61	10	33	7
Tiazopir	397,0	377,0	36	10	31	18	397,0	334,9	36	10	39	18
Tralcoxidim	330,1	284,1	41	10	17	22	330,1	138,0	41	10	27	10

Trialato	303,9	82,9	66	10	71	10	303,9	142,9	66	10	37	10
Triasulfurón	402,1	167,1	84	10	25	6,5	402,0	141,0	81	10	29	6
Triciclazol	190,0	136,0	91	10	37	6	190,0	163,1	89	12	31	6,5
Trietazina	230,1	132,0	66	10	29	6	230,0	99,1	66	12	33	6,5
Acefato	184,2	143,0	31	10	13	10	184,2	124,9	31	10	25	8
BYI08330-enol-glucósido	464,98	303,2	86	10	19	16	464,98	302,0	86	10	17	16
BYI08330-monohidroxi	304,3	254,2	41	10	23	20	304,3	91,1	41	10	59	14
Azinfós-metilo	317,98	132,0	66	10	21	14	317,98	160,0	66	10	11	10
BYI08330-ketohidroxi	318,1	300,1	106	10	17	16	318,1	214,0	106	10	35	12
Tepraloxidim B	342,0	250,0	71	10	19	14	342,0	166,0	71	10	29	12
Tralcoxidim B	330,1	284,1	41	10	17	22	330,1	138,0	41	10	27	10
2,4-D	220,9	163,0	-65	-10	-20	-14	218,9	161,0	-65	-10	-20	-14
Bromoxinil	275,7	80,9	-40	-10	-30	-9	275,7	78,9	-40	-10	-30	-7
Fluacinam	462,8	416,0	-45	-10	-26	-27	462,8	398,1	-45	-10	-22	-27

Ioxinil	369,7	127,0	-55	-10	-38	-15	369,7	215,0	-55	-10	-40	-13
Teflubenzurón	378,8	338,9	-35	-10	-16	-15	378,8	195,9	-35	-10	-30	-17
Dinoterbo	239,0	207,0	-100	-4,5	-38	-18	239,0	46,0	-100	-4,5	-82	-4
Orizalina	345,1	281,0	-155	-10	-26	-21	345,1	78,0	-90	-10	-60	-10
Propoxicarbazona	396,96	156,0	-20	-10	-16	-7	396,96	112,9	-20	-10	-34	-11
Triclopir	253,9	196,0	-55	-4,5	-16	-18	255,9	198,0	-55	-4,5	-16	-18
Ácido acibenzolar	178,9	107,0	-60	-10	-24	-9	178,9	57,0	-60	-10	-46	-7
BYI08330-enol	300,2	214,0	-170	-10	-42	-17	300,2	145,0	-170	-10	-56	-13
TPP	327,1	151,9	106	10	47	10	-	-	-	-	-	-

Abreviaturas. CE: *Collision Energy*; CXP: *Collision Cell Exit Potential*; DEET: *N,N*-dietyl-*m*-toluamida; DMSA: *N,N*-dimetil-*N*-fenilsulfamida (metabolito de la diclofluánida); DMST: *N,N*-Dimetil-*N*-tolilsulfonildiamida; DP: *Declustering Potential*; EP: *Entrance Potential*; EPN: O-Etil O-(4-nitrofenil) fenilfosfonato; TPP: fosfato de trifenilo.

CAPÍTULO III

CONTROL AMBIENTAL

Determinación de contaminantes en muestras ambientales mediante GC-LRMS y GC- HRMS



1. INTRODUCCIÓN

En el ámbito medioambiental, la calidad de los recursos hídricos merece especial atención, debido principalmente a que son imprescindibles para el consumo humano y a que desempeñan un papel vital en la supervivencia y sostenibilidad de los ecosistemas. Las aguas están sometidas a grandes riesgos, fundamentalmente relacionados con la contaminación, que compromete su calidad, y al mismo tiempo, amenaza severamente su disponibilidad sostenible a largo plazo en un estado de calidad adecuado. En este contexto, en las últimas décadas ha surgido un creciente interés y preocupación en cuanto al ámbito medioambiental y la salud humana se refiere, debido a la presencia de compuestos particularmente ubicuos, persistentes y tóxicos como son los mundialmente conocidos POPs, y entre ellos, los PAHs. Además, como consecuencia de su baja solubilidad en agua y su alta naturaleza hidrofóbica, los POPs tienden a asociarse con las partículas de materia y a acumularse en los sedimentos acuáticos, donde pueden permanecer largos períodos de tiempo, bioacumulándose a través de la cadena alimentaria ^(1,2).

Todo ello justifica la necesidad actual de desarrollar y aplicar metodologías analíticas fiables, selectivas y sensibles capaces de identificar y cuantificar estos contaminantes, incluso a niveles traza, dentro de los límites requeridos por la legislación. Teniendo en cuenta el elevado número de compuestos a monitorizar en este tipo de matrices

¹ S. Gómez-Lavín, D. Gorri, A. Irabien, *Assessment of PCDD/Fs and PCBs in sediments from the Spanish Northern Atlantic Coast*, *Water Air Soil Pollution*, 221 (2011) 287-299

² M. R. Moore, W. Vetter, C. Gaus, G. R. Shaw, J. F. Müller, *Trace organic compounds in the marine environment*, *Marine Pollution Bulletin*, 45 (2002) 62-68

ambientales, resulta de interés el desarrollo de métodos multifamilia de contaminantes orgánicos.

En lo que se refiere a la extracción de los POPs, y en particular de los PAHs en muestras acuosas, la SPE ^(3,4) ha sido la técnica más utilizada durante años, seguida de otras como SPME ⁽⁵⁾, LPME ⁽⁶⁾ o SBSE ⁽⁷⁾. En lo referente a muestras de sedimentos, los POPs son principalmente extraídos mediante técnicas como Soxhlet ⁽⁸⁾ y PLE ⁽⁹⁾. Además, suelen aplicarse etapas de limpieza exhaustivas basadas en columnas empacadas con sorbentes (de sílice, alúmina y/o carbón) para estos compuestos ^(8,9).

En cuanto a la determinación instrumental, para este tipo de problemas analíticos y con objeto de mejorar la selectividad y fiabilidad de la

³ E. Bizkarguenaga, O. Ros, A. Iparraguirre, P. Navarro, A. Vallejo, A. Usobiaga, O. Zuloaga, *Solid-phase extraction combined with large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry for the multiresidue determination of priority and emerging organic pollutants in wastewater*, *Journal of Chromatography A*, 1247 (2012) 104-117.

⁴ A. Kouzayha, M. A. Iskandarani, S. Mokh, A. R. Rabaa, H. Budzinski, F. Jaber, *Optimization of a solid-phase extraction method using centrifugation for the determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in water*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (2011) 7592-7600.

⁵ I. Domínguez, F. J. Arrebola, R. Romero-González, A. Nieto-García, J. L. M. Vidal, A. G. Frenich, *Solid phase microextraction and gas chromatography coupled to magnetic sector high resolution mass spectrometry for the ultra-trace determination of contaminants in surface water*, *Journal of Chromatography A*, 1518 (2017) 15-24.

⁶ J. A. López-López, E. Ogalla-Chozas, P. A. Lara-Martín, M. G. Pintado-Herrera, *Solvent bar micro-extraction (SBME) based determination of PAHs in seawater samples*, *Science of the Total Environment*, 598 (2017) 58-63.

⁷ N. Barco-Bonilla, R. Romero-González, P. Plaza-Bolaños, J. L. Fernández-Moreno, A. G. Frenich, J. L. M. Vidal, *Comprehensive analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater using stir bar sorptive extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry*, *Analytica Chimica Acta*, 693 (2011) 62-71

⁸ K. S. Kim, S. C. Lee, K. H. Kim, W. J. Shim, S. H. Hong, K. H. Choi, J. H. Yoon, J. G. Kim, *Survey on organochlorine pesticides, PCDD/Fs, dioxin-like PCBs and HCB in sediments from the Han river, Korea*, *Chemosphere*, 75 (2009) 580-587.

⁹ Y. Liber, B. Mourier, P. Marchand, E. Bichon, I. Perrodin, J. P. Bedell, *Past and recent state of sediment contamination by persistent organic pollutants (POPs) in the Rhône River: Overview of ecotoxicological implications*, *Science of the Total Environment*, 646 (2019) 1037-1046.

detección, actualmente son los sistemas cromatográficos acoplados a MS los más robustos para llevar a cabo los análisis con garantías de calidad en los resultados. Por ello, en los últimos años las técnicas más ampliamente utilizadas en este contexto analítico se basan en la aplicación de GC-LRMS, especialmente con analizadores de *QqQ*. Sin embargo, el nuevo marco legal conllevó a una serie de dificultades en la aplicación de estas técnicas en términos tanto de sensibilidad como de seguridad en la identificación, tornándose necesaria la aplicación de técnicas más avanzadas y potentes, como es el caso de la HRMS (por ejemplo tipo sector magnético) acoplada a la GC, que permite determinar los contaminantes orgánicos prioritarios a los niveles de concentración extremadamente bajos (pg/L, ng/L) exigidos.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, en el tercer capítulo de esta Tesis se incluyen dos publicaciones; la primera de ellas consiste en un capítulo de libro que ofrece una visión global del “estado del arte” de los métodos de análisis disponibles para POPs en muestras de agua y sedimentos mediante técnicas de HRMS. Asimismo, en segundo lugar, se he desarrollado un método analítico para el análisis en rutina de 12 PAHs en diferentes tipos de aguas mediante GC-MS/MS aplicando una etapa de SPE, con el objetivo prioritario de cumplir con las exigencias de la legislación vigente. El método ha sido validado en aguas residuales, de mar, de consumo y continentales no tratadas, (en términos de recuperación, precisión, linealidad, límites de detección y cuantificación e incertidumbre) y acreditado bajo la norma internacional ISO/IEC/17025. Adicionalmente, ha sido aplicado en el análisis en rutina de muestras de agua reales.

2. APLICACIONES ACTUALES DE GC-(Q)TOF Y GC-HRMS PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES EN MUESTRAS DE AGUA Y SEDIMENTOS

2.1. INTRODUCCIÓN

El actual desarrollo industrial y antropogénico ha contribuido al uso y producción de productos químicos, productos de degradación y subproductos (1,2). Muchos de estos compuestos a menudo alcanzan el ecosistema marino (1), el cual, desafortunadamente, representa el reservorio final a nivel mundial de muchos residuos humanos/industriales. Este es el caso de los POPs, un heterogéneo grupo de compuestos tóxicos que han sido producidos e introducidos en el medio ambiente en grandes cantidades desde la década de los 50 (3,4). Más recientemente, un grupo inicial de POPs, que fueron reconocidos por el Convenio de Estocolmo (5,6) como causantes de efectos adversos en los humanos y en los ecosistemas, ha sido dividido en tres categorías principales (6,7): (i) plaguicidas organoclorados (OCPs, tales como aldrina, clordano, DDT, dieldrina, endrina, heptacloro, HCB, mirex, toxafeno), (ii) químicos industriales (HCB y PCBs), y (iii) subproductos generados por procesos industriales o incineración, tales como PCDDs y PCDFs, ambos también conocidos como PCDD/Fs o con el término de "dioxinas" (6-8). En la **Figura 3.1** se muestran algunos ejemplos de POPs.

En general, los POPs se caracterizan por una elevada lipofilia y una notable estabilidad físico-química y biológica (1,3,9). Por tanto, estos compuestos tienden a persistir en el medio ambiente y a bioacumularse y biomagnificarse a través de la cadena alimentaria (notablemente en el

tejido graso de los animales) a lo largo de un amplio rango de niveles tróficos (1,9-11).

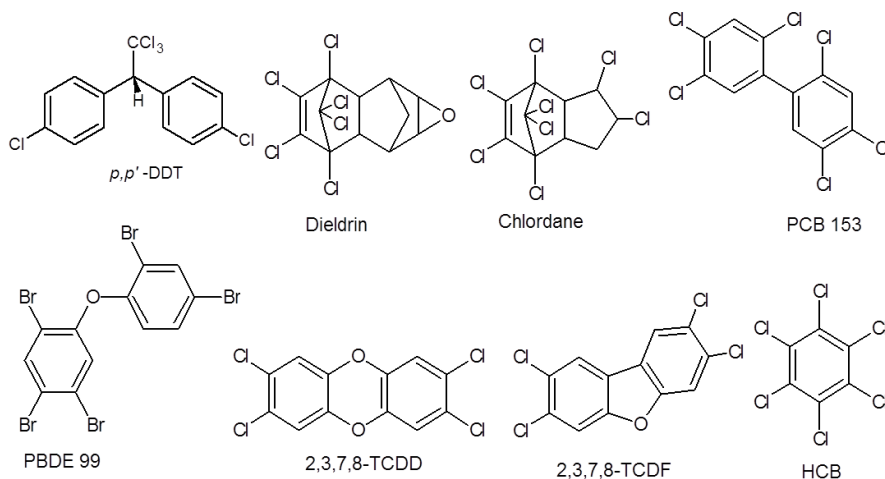


Figura 3.1. Estructuras de algunos ejemplos de plaguicidas organoclorados (*p,p'*-DDT, dieldrina, clordano y HCB), difeniléteres bromados (PBDE 99), dibenzofuranos policlorados (2,3,7,8-TCDF) y dibenzo-*p*-dioxinas policloradas (2,3,7,8-TCDD).

Adicionalmente, considerando que los POPs pueden transportarse a lo largo de extensas distancias a través de la atmósfera (son semivolátiles), los océanos, y otras vías, estos compuestos químicos pueden estar presentes en regiones muy alejadas de su fuente de origen, incluso dónde nunca han sido utilizados o producidos (1,10, 12). En este sentido, los POPs pueden particularmente incorporarse a los ecosistemas marinos y de agua dulce a través de diversos medios, como son la deposición atmosférica, las descargas directas e indirectas y los aportes fluviales (10,13). Además, como consecuencia de su baja solubilidad acuosa y su elevada naturaleza hidrofóbica, los POPs tienden a asociarse con las partículas y acumularse en los sedimentos acuáticos (1,9,10,14,15), dónde pueden permanecer durante años debido a su

persistencia y largas vidas medias ⁽¹⁾. Como resultado, los sedimentos fluviales y de estuarios pueden constituir importantes reservorios de POPs, actuando como una fuente de contaminantes por liberación a largo plazo y reintroducción en el ecosistema y la cadena alimentaria ^(1,9,10,16). Por tanto, la contaminación de agua y sedimentos representa un riesgo significativo para los organismos acuáticos, que tienden a bioacumular POPs, y para los humanos, a través del consumo de productos del mar contaminados ^(1,15). De hecho, se ha demostrado que pueden presentar efectos potencialmente dañinos sobre la salud humana y de los animales, incluyendo cáncer, daños al sistema nervioso, desórdenes reproductivos y disrupción del sistema inmune ⁽¹⁷⁻²⁰⁾. Como consecuencia, actualmente el análisis de sedimentos es altamente necesario para poder evaluar la distribución espacial, las tendencias temporales y las posibles fuentes de contaminantes ^(16,21,22). Por esta razón, el estudio de la presencia y bioacumulación de POPs en el medio ambiente se ha visto incrementado durante las últimas décadas ⁽³⁾. Tal como se mencionó previamente, los POPs están oficialmente registrados por el UNEP ⁽¹²⁾ bajo el Convenio de Estocolmo (firmado en 2001 y vigente en 2004) ^(5,6,8,23). Este panel de expertos ha pedido el establecimiento de un plan de monitorización global para el análisis de POPs ^(12,23). Además, recientemente se han propuesto otros contaminantes para su inclusión en la lista, como los PBDEs ⁽⁴⁾ y cinco nuevo OCPs que fueron añadidos en 2009 ⁽⁶⁾. Así, el Convenio de Estocolmo, junto con los Reglamentos de la Comisión (UE) N° 756/2010 ⁽²⁴⁾, 757/2010 y 519/2012 ⁽²⁵⁾ sobre POPs ⁽²⁶⁾, modificando el Reglamento (CE) N° 850/2004 ⁽²⁷⁾, han establecido medidas para reducir y eliminar sus emisiones a fin de minimizar su presencia en el medio ambiente. Adicionalmente, la Directiva Europea 2008/105/CE ⁽²⁸⁾ sobre

estándares de calidad ambiental en el campo de la política de aguas, requiere que los Estados Miembros lleven a cabo una monitorización de los sedimentos en relación con la WFD para controlar una lista de sustancias prioritarias. Algunos POPs, tales como PCBs y PCDD/Fs, están incluidos para su posible identificación como sustancias peligrosas prioritarias ⁽¹⁴⁾.

No obstante, pese a las medidas establecidas y al hecho de que la producción de la mayoría de los POPs cesó hace más de 20 años, todavía persisten en el medio ambiente niveles considerables de estos tóxicos ⁽³⁾. Por tanto, existe una ineludible necesidad de desarrollar métodos para monitorizarlos en los sistemas acuáticos marinos. Asimismo, para evaluar el riesgo al que está sometido la fauna y la salud humana, la monitorización de estos contaminantes en los sedimentos representa una importante prioridad dentro del análisis medioambiental. Debido a que para esta causa la aplicación de métodos basados en LC-MS no resulta efectiva, la técnica de GC-MS ha sido ampliamente utilizada para investigar la presencia de contaminantes orgánicos en muestras medioambientales a lo largo de los años. Generalmente, los POPs están presentes a bajas concentraciones en las muestras de sedimentos y agua, de modo que los métodos analíticos se ven obligados a incluir etapas de extracción y enriquecimiento previos al análisis mediante GC ⁽²⁹⁾. El análisis de este grupo de compuestos en matrices medioambientales es complejo debido a que los POPs pueden mostrar diversas propiedades físico-químicas y a la presencia de interferentes de la matriz. Por ello, se necesitan técnicas de detección altamente selectivas, sensibles, exactas y precisas, junto con tediosos procedimientos de limpieza, particularmente en el caso del análisis de PCDD/Fs, PCBs y PBDEs en sedimentos ^(4,30). En este contexto, GC-HRMS es una poderosa

herramienta para la inequívoca determinación de POPs (incluso a niveles de ultratrazas) mostrando elevada eficacia, alta sensibilidad en el modo de adquisición de barrido completo o “full-scan” y alta exactitud de masa ⁽³¹⁾. De hecho, GC-HRMS basada en el uso de instrumentos de sector magnético es ampliamente utilizada para el análisis de trazas de contaminantes orgánicos (mayoritariamente PCDD/Fs) en estudios medioambientales. No obstante, en este capítulo se ha observado un creciente interés en HRMS con analizadores de TOF-MS durante los últimos años ⁽³¹⁾.

Brevemente, este capítulo muestra una visión general de las nuevas tendencias, principalmente desde 2005, basadas en el análisis actual de muestras de agua y sedimentos y centrándose específicamente en los analizadores de GC-TOF-MS ^(29,32) y HRMS ^(8,13,14,16,33). Con respecto al procedimiento de extracción, se han revisado varias técnicas, tales como la tradicional LLE y SPE para muestras acuosas o SLE para sedimentos. Adicionalmente, métodos miniaturizados como SPME y SBSE han sido también descritos para determinar cantidades a niveles trazas de contaminantes orgánicos en muestras de agua.

2.2. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS

En general, la determinación a nivel de trazas de contaminantes orgánicos en muestras medioambientales requiere el uso de métodos con múltiples etapas de preparación de muestra que implican un gran consumo de tiempo. Esto se debe a los extremadamente bajos niveles a los que se encuentran (de pg/L a ng/L) en las muestras de sedimentos y agua, y a la presencia de los interferentes de la matriz (a menudo a concentraciones más elevadas que los propios POPs) (**Figura 3.2**). Además, son necesarios bajos LODs (del orden de µg/L a pg/L). Normalmente, el análisis de POPs se caracteriza también por la

coexistencia de complejas mezclas de congéneres (por ejemplo, 210 PCDD/Fs, 209 PCBs, o 209 congéneres de PBDEs) en las muestras ⁽³⁾. Por ello, para su adecuada determinación, suele ser necesaria la aplicación de una etapa de pretratamiento de la muestra rigurosa y exhaustiva (Tablas 3.1 y 3.2).

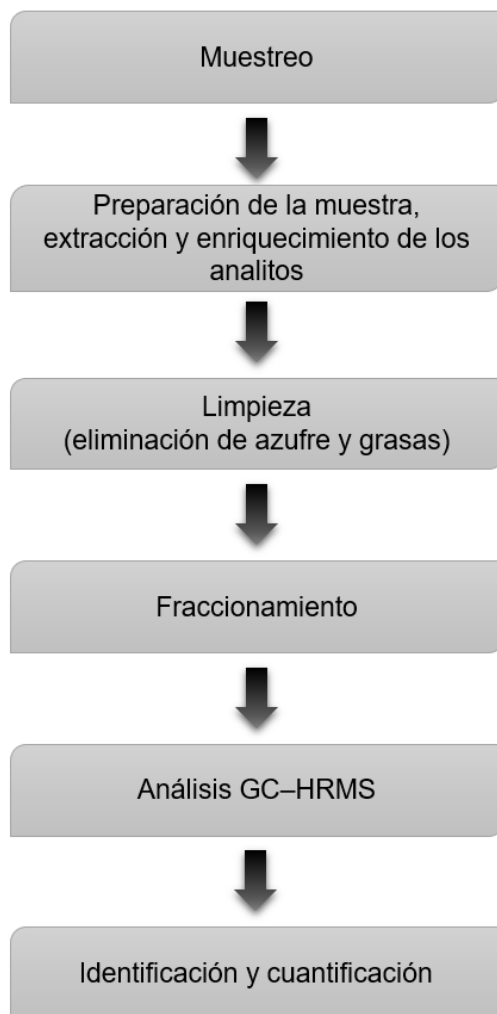


Figura 3.2. Esquema del procedimiento general para la determinación de POPs en muestras medioambientales usando GC-HRMS.

2.2.1. Extracción de muestras de agua

En general, la LLE ha sido ampliamente empleada para la extracción de muestras de agua, a pesar de ser una técnica que requiere mucho tiempo y trabajo, ser tediosa y precisar de grandes cantidades de disolventes orgánicos (29,34). De hecho, ha sido usada en métodos de referencia tales como el Método 1613 de la EPA para la determinación de PCDD/Fs (35). Además, es necesario también una gran volumen de muestra (incluso 1000 mL en algunos casos) (29,36) (**Tabla 3.1**). Como alternativa, la SPE permite reducir el consumo de disolventes, siendo C18 la fase estacionaria más habitual para la extracción de compuestos no polares y moderadamente polares (36,37). Sin embargo, la SPE todavía requiere de grandes volúmenes de muestra y el factor de enriquecimiento puede ser limitado; así, para lograr LODs por debajo del orden de ng/L, a menudo se necesita una concentración final del extracto a pequeño volumen (<1 mL) o el uso de LVI (29). Los POPs también pueden extraerse usando discos de SPE y sometiendo la fase sólida y el residuo obtenidos en el filtro a un proceso clásico de extracción por Soxhlet (38) (**Tabla 3.1**).

Más recientemente, se han aplicado también métodos miniaturizados, tales como SPME (39) y SBSE (29), al análisis de POPs en muestras acuosas. En estas técnicas los analitos son extraídos de la matriz líquida mediante una fase líquida inmiscible, principalmente PDMS (29,34), empaquetada en una fibra (SPME) o en una barra magnética agitadora (SBSE). En el caso de SPME, se han utilizado con éxito otras fases, tales como CW/DVB. Además, se puede añadir NaCl a la matriz líquida para modificar la fuerza iónica e incrementar el rendimiento de la extracción (39). Tanto la SPME como la SBSE son técnicas sin disolventes que permiten la concentración y purificación simultánea de las muestras

(^{29,39}). Y gracias a que la fracción extraída (ya sea en una fibra o en una barra agitadora) puede ser introducida cuantitativamente en el sistema GC por TD, estas técnicas aportan una mayor selectividad. Además, la combinación de la TD con SPME y SBSE, hace que éstas sean más útiles y eficientes para el análisis de trazas, ya que se reduce la probabilidad de pérdida de muestra y contaminación; se requiere un menor volumen de muestra en comparación con SPE (por ejemplo, 10-50 mL) y el proceso de extracción puede ser totalmente automatizado (²⁹). Por otro lado, también se puede llevar a cabo la desorción líquida, realizando una nueva extracción de vuelta de los analitos con un disolvente orgánico. Para la extracción de POPs altamente apolares de muestras acuosas, a menudo se añade un modificador orgánico a fin de minimizar la adsorción a las paredes, como metanol o acetona (²⁹) (**Tabla 3.1**).

Las muestras de agua también han sido analizadas usando dispositivos de membrana semipermeable (SPMDs). El uso de SPMD es una estrategia de muestreo pasivo (⁴⁰), que permite la toma de muestras representativas y el aislamiento y pre-concentración simultáneo de los analitos. Así, ha sido descrito el análisis de PCBs y OCPs en agua mediante SPMD (un tubo de polietileno de baja densidad, LDPE, plano y relleno con trioleína sintética) (⁴⁰) (**Tabla 3.1**).

2.2.2. Extracción de sedimentos

La monitorización de los POPs está focalizada principalmente en matrices sólidas, tales como sedimentos, debido a su anteriormente citado carácter hidrofóbico, y a su notablemente baja concentración en aguas ambientales en comparación con aguas residuales y otras muestras sólidas. Para analizar POPs en sedimentos es todavía frecuente aplicar la tradicional extracción con Soxhlet, que normalmente

Tabla 3.1. Comparativa de técnicas de extracción y separación de POPs en muestras de agua.

Analitos (nº)	Pretratamiento de la muestra	Técnica de separación/detección	LOD (unidades)	Observaciones	Ref.
OCPs (16) PCBs (3, análisis no objetivo)	a) SBSE-TD: adición de acetona (5 mL); barras (10 and 20- mm) empaquetadas con PDMS (0,5 mm), temperatura ambiente, 1500 rpm, 3 h. b) adición de 5% NaCl; LLE (3 x 0,5 L, CH ₂ Cl ₂); adición de hexano (500 mL); secado Na ₂ SO ₄ ; concentración a 3 mL; limpieza: columna cromatográfica (Florisil y gel sílice); concentración a 100µL.	a) GC x GC - EI-HRTOF-MS b) GC-EI-HRMS (SIM)	a)10-44 pg L ⁻¹	a) Columna capilar de sílice fundida DB-5 (10 m x 0,18 mm x 0,18 µm) ² D: columna capilar de sílice fundida BPX-50 (1,0 m x 0,10 mm x 0,10 µm); inyección: modo <i>splitless</i> b) Columna capilar de sílice fundida DB-17HT (30 m x 0,32 mm x 0,15 µm); inyección: modo <i>splitless</i>	[29]
PCBs, OCPs, HCB, PBDEs (11)	SPME: fibra CW/DVB (65µm) con 10% NaCl; agitación (45 min, temperatura ambiente); TD	GC-EI-TOF-MS	N.D.	Columna capilar de sílice fundida HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	[39]
PCBs, plaguicidas, PBDEs, otros contaminantes	SPE (cartuchos <i>Bond Elut</i> C18); elución con AcOEt:CH ₂ Cl ₂ (1:1); evaporación a sequedad; redisolución (hexano, 0,5 mL)	GC-EI-TOF-MS	N.D.	Columna capilar de sílice fundida HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); inyección: modo <i>splitless</i>	[37]
PCDD/Fs y PCBs	Filtración por succión; secado de fase sólida y del residuo en el filtro; Soxhlet 1) acetona (8 h); 2) tolueno (16 h); concentración; limpieza: columnas cromatográficas	GC-HRMS (SIM)	0,005pg L ⁻¹ (PCDD/Fs) 0,01 pgL ⁻¹ (PCBs)	a) SP-2331 (60 m x 0,25 mm x 0,2 µm) (TeCDD/Fs, PeCDD/Fs, HxCDD/Fs)	[38]

Analitos (nº)	Pretratamiento de la muestra	Técnica de separación/detección	LOD (unidades)	Observaciones	Ref.
	multicapa de gel de sílice y carbono grafitizado poroso			b) DB-17HT (30 m x 0,25 mm x 0,15 µm) (HpCDD/Fs, OCDD/F) c) HT8-PCB (60 m x 0,25 mm x 0,15 µm) (PCBs similares a dioxinas) Inyección: modo <i>splitless</i>	
PCBs, OCPs y PAHs	SPMD (LDPE 65µm); agitación con ciclohexano (100 mL) toda la noche; secado con Na ₂ SO ₄ (fase orgánica); evaporación a sequedad y redisolución (<i>n</i> -hexano: CH ₂ Cl ₂ , 1:1); limpieza: columna mixta de gel de sílice (sílice + alúmina con 3% H ₂ O+ Na ₂ SO ₄); SPE (C18); concentración (a 20 µL)	GC-EI-HRMS (SIM)	N.D.	PCBs: Rtx-CL Pesticides2 (30 m x 0,25 mm x 0,2 µm) OCPs: Rtx-Dioxin2 (40 m x 0,18 mm x 0,18 µm) Inyección del sistema en frío	[40]
OCPs, HCB	Filtración (disco de extracción); Soxhlet (acetona, 16 h).	GC-EI- HRMS (SIM)	N.D.	Columna ENV-8MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	[11]

Abreviaturas: EI: ionización electrónica; N.D: no disponible; PCBs: bifenilos policlorados; PCDD/Fs: dioxinas and furanos; SBSE-TD: extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras con desorción térmica; SIM: monitorización de iones seleccionados; SPE: extracción en fase sólida; SPMD; dispositivo de membrana semipermeable; SPME: microextracción en fase sólida.

va seguida por un procedimiento de limpieza con múltiples etapas (11,14,22,30,41-43). Esta técnica también se emplea en el método de referencia de la EPA 1613 para PCDD/Fs (35). No obstante, el Soxhlet presenta desventajas perfectamente conocidas, tales como el consumo de extensas cantidades de disolventes orgánicos y la alta manipulación a la que se ve sometida la muestra, además de que su aplicación implica una gran cantidad de tiempo (34,44). Se han aplicado técnicas alternativas, entre las que se incluyen MAE (22,43) y PLE (13,43,45,46), que son ampliamente utilizadas en sustitución de la extracción por Soxhlet (34,44,45). Más recientemente, se ha empleado una técnica de PLE con una trampa de carbono integrada (PLE-C), que utiliza un carbono disponible *Norit SA 4PAH HF*, y que ha sido aplicada para el análisis de PCDD/Fs en materiales de referencia certificados (CRM) de sedimentos, permitiendo mayores rendimientos de extracción de muestras que los métodos convencionales. Se pueden encontrar más detalles y ventajas de esta técnica en la referencia aquí citada (44) (**Tabla 3.2**).

Con respecto a la etapa de limpieza de las muestras de sedimentos, la metodología más asiduamente aplicada es la cromatografía de adsorción sólido-líquido (13,30,41,45), que puede consistir en una sola columna multicapa cargada con varias combinaciones de todos los sorbentes necesarios (42,44). Así, para eliminar co-extractantes no volátiles se puede usar gel de sílice acidificado, neutro y básico, otros adsorbentes basados en gel de sílice y alúmina (41), mientras que un paso adicional para aislar compuestos planares (por ejemplo PCDD/Fs o *dl*-PCBs) de los no planares (por ejemplo PCBs), se lleva a menudo a cabo incluyendo materiales basados en carbón (13,45), como carbón activo (22), PGC o una columna de 2-(1-pirenil)etil dimetilsililo al final de la etapa de limpieza (**Tabla 3.2**). Usando estas columnas de carbón, el

procedimiento normal consiste en la elución de contaminantes no polares usando un disolvente apolar (por ejemplo, hexano) y una elución en dirección reversa de los contaminantes objetivo con tolueno (4,13). Sin embargo, cuando se lleva cabo el análisis simultáneo de PBDEs, PCBs y PCDD/Fs, la separación total entre estos grupos es considerablemente complicada (30), lo que dificulta el análisis mediante GC, independientemente del detector empleado. En particular, la separación de PBDEs, PCBs y PCDD/Fs en tres fracciones independientes ha sido llevada a cabo incluyendo sílice-AgNO₃ dentro de una columna de sílice multicapa, conectada a la salida a dos columnas de alúmina básica y Florisil, respectivamente (30). Adicionalmente, se pueden realizar otros tratamientos como la eliminación de azufre elemental (el principal co-extractante presente normalmente en sedimentos) utilizando GPC o mediante la reacción con cobre (generalmente polvo de cobre) y su consecuente precipitación como CuS (4,22,30) (**Tabla 3.2**). También se puede llevar a cabo un tratamiento ácido con LLE (normalmente con H₂SO₄) previo a la cromatografía de adsorción para eliminar otros interferentes remanentes de la matriz (41). Y como alternativa a las metodologías de limpieza comentadas, para minimizar la manipulación de la muestra y reducir el tiempo de análisis (~3h), durante los últimos años se ha utilizado frecuentemente un sistema automatizado de limpieza multicolumna (por ejemplo, el sistema *Power-PrepTM* de *Fluid Management SystemTM*), que consiste en columnas multicapa desechables de sílice, alúmina y PGC (4,14,44) (**Figura 3.3**). Sin embargo, esta metodología presenta algunas desventajas, como son el coste del equipo y el elevado gasto de disolventes orgánicos puros (44).

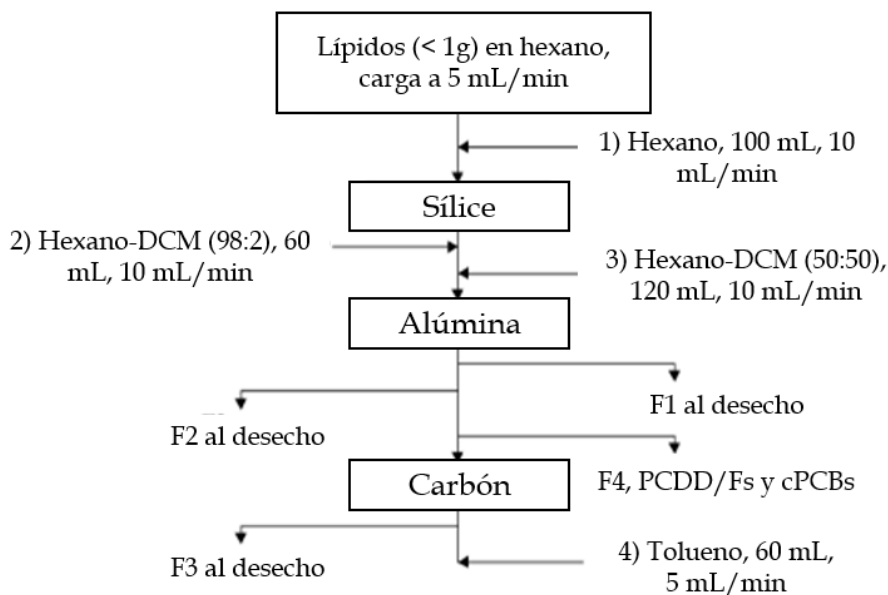


Figura 3.3. Diagrama de flujo sobre el conjunto de columnas del sistema de limpieza automatizado Power-Prep™ aplicado para PCDD/Fs y PCBs. Imagen cortesía de Elsevier (referencia ⁵²).

Por otro lado, para el análisis de algunos POPs en sedimentos marinos también puede aplicarse la saponificación. Así, mediante la adición de KOH o NaOH etanólico o metanólico, se puede llevar a cabo la extracción y eliminación simultánea de azufre elemental y la disociación de sustancias húmicas (limpieza) ⁽⁴³⁾.

Análogamente, para extraer muestras de sedimentos también está la alternativa del método de sonicación, introduciendo la muestra en el baño de agua de ultrasonidos en presencia de un disolvente adecuado, tal como acetona ⁽⁴³⁾. Y otra estrategia de limpieza que se ha aplicado para el análisis de POPs en muestras de sedimentos es la LLE (por ejemplo, usando hexano, agua y H₂SO₄) seguida por una SPE para OCPs y HCB ⁽¹¹⁾ o PCBs ⁽⁴³⁾ (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Resumen de las principales metodologías de extracción, limpieza y separación usadas para el análisis de POPs en sedimentos.

Analitos (n°)	Pretratamiento de la muestra	Técnica de separación/detección	LOD (unidades)	Observaciones	Ref.
PCDD/Fs, <i>dl</i> -PCBs, HCB	a) PCDD/Fs y HCB: secado al aire; Extracción Soxhlet (tolueno, 16 h); limpieza: tratamiento con H ₂ SO ₄ , columna de sílice multicapa (Na ₂ SO ₄ , gel sílice, 30% KOH-gel sílice, gel sílice, 44% H ₂ SO ₄ -gel sílice, gel sílice, 10% AgNO ₃ -gel sílice, Na ₂ SO ₄) y columna alúmina. b) <i>dl</i> -PCBs: Método EPA 1668; limpieza: columnas gel sílice multicapa y alúmina.	GC-HRMS (SIM)	0,01 - 500 ng/kg	A) PCDD/Fs: columna DB-5MS (60 m x 0,32 mm x 0,25 μm); HCB: columna DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) B) <i>dl</i> -PCBs: columna DB-5MS (60 m x 0,32 mm x 0,25 μm)	[41]
PCDD/Fs (17) <i>dl</i> -PCBs (12)	PLE (tolueno:acetona, 70:30, <i>v/v</i>); limpieza: columnas cromatográficas sílice, Florisil y Celita/carbón	GC-HRMS	0,0009 pg/g de peso seco (PCDD/Fs) 0,036 pg/g de peso seco (<i>dl</i> -PCBs)	Columna DB-5MS	[51]
PCDD/Fs PCBs	Soxhlet (tolueno, 24 h); evaporación hasta peso constante; limpieza: 1) columna sílice multicapa (Na ₂ SO ₄ anhidro+ gel sílice + 44% (peso por peso) H ₂ SO ₄ /gel sílice gel+ gel sílice + 10% nitrato de plata/sílice + Na ₂ SO ₄ anhidro); 2) columna de alúmina activada; concentración.	GC-EI-HRMS	N.D.	Columna Rtx-5ms (60 m x 0,25 mm x 0,1 μm)	[45]
PCDD/Fs (17), <i>c</i> -PCBs	a) Liofilización; Soxhlet (tolueno); limpieza: 1) Na ₂ SO ₄ + columna gel sílice; 2) columna de carbón activado y and Celita; 3) columna óxido aluminio; Precipitación de S usando polvo de Cu activado. b) Secado al aire; Soxhlet (tolueno); limpieza: columna de gel sílice /NaOH, gel sílice/H ₂ SO ₄ , Al ₂ O ₃ ácido, carbón activo AX-21/Celita.	GC-HRMS	N.D.	Columna DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) DB-17 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) (separación cromatográfica complementaria de PCDD/Fs)	[22]

Analitos (n°)	Pretratamiento de la muestra	Técnica de separación/detección	LOD (unidades)	Observaciones	Ref.
	c) Secado al aire; MAE (extracción asistida por microondas, tolueno:metanol, 9:1); limpieza: columna cromatográfica (columna sílice/columna alúmina / carbón activo/columna Celita).				
PBDEs (20)	Liofilización y tamizado; Soxhlet (10% acetona en tolueno, 200 mL, 24 h); concentración y redisolución en hexano; limpieza: columna multicapa de gel sílice (Na ₂ SO ₄ + 10% AgNO ₃ -gel sílice + 22% H ₂ SO ₄ - gel sílice + 44% H ₂ SO ₄ -gel sílice +gel sílice + 2% KOH-sílice); concentración and redisolución en nonano.	GC-EI-HRMS (SIM)	0,1 - 0,5 pg/g (mono- a hepta-BDEs) 1 pg/g (deca-BDE)	DB5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,1 µm) (separación de congéneres mono- a hepta-BDEs) DB5-MS (15 m x 0,25 mm x 0,1 µm) (separación congéneres deca-BDEs)	[42]
OCPs, HCB	Sedimentos: secado al aire; Soxhlet (300 mL acetona, 16 h); concentración; LLE (hexano); concentración; SPE (i) cartucho Florisil; ii) carbón activo ENVI-Carb; concentración	GC-EI- HRMS (SIM)	N.D.	Columna ENV-8MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	[11]
PCBs (62)	Secado al aire ; a) Saponificación (50 mL hidróxido potásico etanólico 1M, 80°C con reflujo o a temperature ambiente, agitación 1h); adición de hexano (50 mL); filtración (filtro de fibra de vidrio, 47 mm); LLE (agua, 50 mL); LLE (hexano, 50 mL); agitación con H ₂ SO ₄ (98%, 3 times); lavado (LLE, agua, dos veces); secado (Na ₂ SO ₄); reducción de volumen a 1 mL; SPE (Sep-Pak Vac, sílice 500 mg) b) PLE (adición de Na ₂ SO ₄ en la celda de extracción); hexano/acetona (1:1, v/v, 10 min, 80°C); adición de polvo de Cu activado; filtración (filtro de membrana PTFE (0,2 µm, diámetro 20 mm); LLE (50 mL hexano + 250 mL agua); LLE	GC-HRMS	N.D.	Columna capilar HT-8 (50 m x 0,22 mm x 0,5 µm, SGE, Australia)	[43]

Analitos (n°)	Pretratamiento de la muestra	Técnica de separación/detección	LOD (unidades)	Observaciones	Ref.
	(50 mL hexano); limpieza: tratamiento con H ₂ SO ₄ ; SPE (<i>Sep-Pak Vac</i> , sílice 500 mg) c) MAE (20 mL hexano/acetona (1:1), 10 min, 100-145°C); centrifugación; limpieza: tratamiento con polvo de Cu activado + Na ₂ SO ₄ ; agitación; filtración (filtro de membrana PTFE, 0,2 μm); SPE (cartucho sílice); cromatografía de líquidos en fase normal, HPLC (columna YMC-Pack NH ₂) d) Adición de Na ₂ SO ₄ ; Soxhlet (hexano/acetona, 1:1, <i>v/v</i> o CH ₂ Cl ₂ , 300 mL, 24h); limpieza: tratamiento con Cu + SPE + HPLC (descrito arriba) e) Adición de agua y acetona (25 mL); agitación (temperatura ambiente, 10 min) y sonicación (200 W, 10 min) x2; centrifugación; disolvente reemplazado con hexano; limpieza: columna de vidrio rellena con gel sílice.				
PCDD/Fs y PCBs	Secado; PLE (hexano:acetona, 75:25, <i>v/v</i> , 120°C, 12 MPa, 2 ciclos 10 min); limpieza: 1) columna (gel sílice activada + gel sílice con 44% H ₂ SO ₄ + gel sílice + anhídrido Na ₂ SO ₄) 2) columna carbón reversible. Fracción PCBs : evaporación; redisolución en ACN; SPE (gel sílice modificada con C18); reducción a 10 μL Fracción PCDD/Fs: columna (alúmina básica); reducción a 10 μL	GC-HRMS (SIM)	PCBs: 0,1-0,2 pg/g peso seco PCDD/Fs: 0,3-1,1 pg/g	PCB: columna Restek Rtx-2330 (90% bis-cianopropil/10% fenil cianopropil polisiloxano) (60 m x 0,25 mm x 0,1 μm) PCDD/Fs: columna Restek Rtx-Dioxin2 (60 m x 0,25 mm x 0,2 μm). Inyección: <i>splitless</i> (sistema de inyección en frío)	[46]
PCDD/Fs, PCBs, PBDEs	Secado en frío; Soxhlet (CH ₂ Cl ₂ :hexano, 1:1, <i>v/v</i> , 150 mL, 24 h); limpieza: 1) adición de polvo de Cu; concentración and redisolución (hexano); 2) columnas gel sílice multicapa (gel	GC-EI-HRMS (SIM)	N.D.	Columna capilar Inyección: modo <i>splitless</i>	[30]

Analitos (n°)	Pretratamiento de la muestra	Técnica de separación/detección	LOD (unidades)	Observaciones	Ref.
	sílice activada, básica y ácida, sílice- AgNO ₃ y Na ₂ SO ₄), alúmina básica y Florisil; 3) GPC (sólo la fracción de PCBs).				
PCDD/Fs y PCBs	Soxhlet (tolueno, 8 h); concentración; adición de hexano y filtración (filtro de fibra de vidrio); limpieza: <i>Power-Prep</i> TM (columnas sílice multicapa, alúmina básica y carbón activo PX-21); concentración a sequedad y redisolución (nonano).	GC-EI-HRMS (SIM)	N.D.	DB-5 MS (5% fenil-95% metilsiloxano) columna capilar de sílice fundida (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Inyección: modo <i>splitless</i>	[14]
PCDD/Fs y PCBs	PLE (hexano:acetona, 75:25, <i>v/v</i> , 120°C, 12 MPa; 2 ciclos estáticos, 10 min); limpieza: 1) concentración de los extractos; 2) etapas LC secuenciales (Na ₂ SO ₄ , gel de sílice activada, gel sílice-NaOH, gel sílice, gel sílice-NaOH, gel sílice, gel sílice con H ₂ SO ₄ , gel sílice y Na ₂ SO ₄); 3) columna carbón reversible: Fracción 1 (PCBs, hexano): evaporación y redisolución en ACN (0,2 mL); SPE (cartucho 1g C18-gel sílice modificada); elución (ACN) y concentración a 0,1 mL (corriente de N ₂). Fracción 2 (PCDD/F, tolueno): limpieza (columna alúmina básica); concentración a 0,1 mL (N ₂).	GC- HRMS (SIM)	N.D.	PCBs: columna Restek Rtx-2330 (90% bis-cianopropil/10% fenil cianopropil polisiloxano) (60 m x 0,25 mm x 0,1 µm); PCDD/Fs: columna Restek Rtx-Dioxin2 (60 m x 0,25 mm x 0,2 µm) Inyección: modo <i>splitless</i> (sistema de inyección en frío)	[13]

Abreviaturas: ACN: acetonitrilo; HPLC: cromatografía de líquidos de alta eficacia; GPC: cromatografía de permeación en gel; LLE: extracción líquido-líquido; MAE; extracción asistida por microondas; N.D.; no disponible; PLE-C: extracción con líquidos presurizados con una trampa de carbón integrada; SPE: extracción en fase sólida.

2.3. ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN (GC-HRMS)

Tal como se mencionó previamente, es necesario un análisis específico para poder discernir entre aquellos congéneres que presentan distintas propiedades toxicológicas. Y GC es la técnica que normalmente se utiliza para la determinación de estas complejas mezclas de contaminantes halogenados. En este contexto, el desarrollo de las columnas capilares de GC permite la determinación específica de congéneres, proporcionando la separación máxima de referencia requerida para la mayoría de los compuestos ⁽³¹⁾. Su acoplamiento a la MS es también necesaria para solventar algunas de estas dificultades analíticas (**Figuras 3.4-3.6**).

Como consecuencia de la compleja composición que caracteriza a la mayoría de las mezclas de POPs, la mayor parte de los estudios han invertido sus esfuerzos en tratar de mejorar y optimizar la resolución cromatográfica ⁽⁴⁹⁾. Con respecto a las fases estacionarias, se usan con frecuencia las columnas apolares o ligeramente polares (**Tablas 3.1 y 3.2**), tales como 100% dimetil polisiloxano (por ejemplo DB-1), fenil-95% metil polisiloxano (por ejemplo DB-5), con un espesor de película de 0,25 μm y longitudes de columna que oscilan de 30 a 60 m (**Figuras 3.5 y 3.6**).

Aunque no sean empleadas con demasiada frecuencia, las columnas más cortas (5-15 m) pueden ser útiles para ciertas aplicaciones (por ejemplo para la determinación de compuestos termolábiles tales como BDE-209), aportando análisis rápidos sin pérdida de resolución ⁽⁴⁾. Así, la separación de mezclas de PBDEs puede ser llevada cabo usando columnas cortas capaces de separar eficientemente nona- y deca-BDEs,

mientras que para separar los BDEs bromados inferiores son adecuadas las columnas más largas ⁽³⁶⁾.

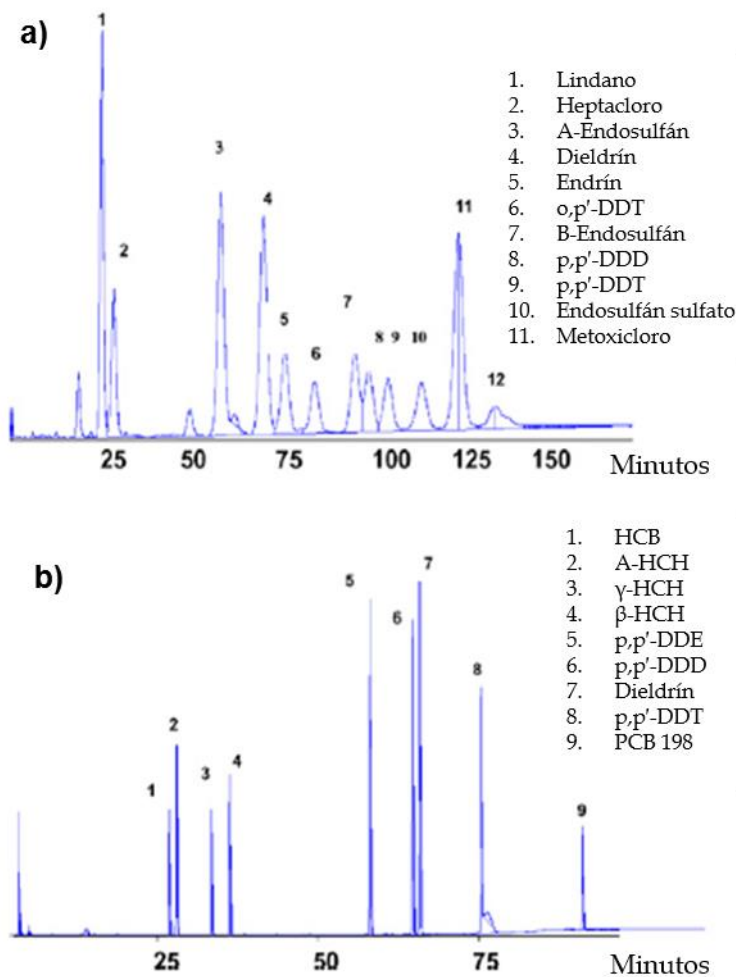


Figura 3.4. Cromatogramas de: (a) mezcla de OCPs en una columna DB 1701 (15 m x 0,53 mm x 5 μm), y (b) mezcla de estándares de OCPs separados usando una BPX35 (50 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Imagen cortesía de Elsevier (referencia ⁽²³⁾).

En la separación por GC es importante mencionar el problema que representa la co-elución de los contaminantes de interés y los interferentes ^(30,49). Por ejemplo, las columnas típicas de 5% fenil exhiben múltiples co-eluciones para PCBs y PCDD/Fs ⁽⁵⁰⁾, mientras que en el

análisis de PBDEs se pueden observar picos no separados que corresponden a BDE-47 y CB-180 ⁽³⁶⁾. Es importante ser consciente de que es imposible encontrar en el mercado una única columna capaz de separar todos los congéneres de los PCBs, PBDEs o PCDD/Fs ⁽⁴⁾. De forma alternativa, pueden usarse fases más polares para identificar compuestos que co-eluyen (por ejemplo, CP-Sil 88 ⁽⁴⁾). En particular, en el análisis de PCDD/Fs y *dl*-PCBs (un grupo de 12 congéneres de PCBs con propiedades toxicológicas que los PCDD/Fs debido a su estructura coplanar), se han desarrollado algunas columnas tales como la DB-Dioxin (44% metil - 28% fenil -20% cianopropil polisiloxano), BPX-DXN, o Rtx-Dioxin2 (fase polisilfenileno). Estas columnas se caracterizan por poseer una fase estacionaria más polar, haciendo posible la separación de pares críticos: (i) 2,3,4,6,7,8-TCDD y 2,3,4,7,8-pentaCDF y (ii) 2,3,4,6,7,8-TCDD y 2,3,4,6,7,8-hexaCDF ⁽⁴⁾. Se ha aportado información acerca de que la columna Rtx-Dioxin2 presenta muy pocos compuestos interferentes, así como de que la BPX-DXN muestra un sangrado notablemente bajo y mejora la separación en comparación con las columnas de 5% fenil ⁽⁵⁰⁾. Alternativamente, se han usado columnas de cristal líquido que proporcionan una separación excepcional para los PCDD/Fs 2,3,7,8-sustituídos. Sin embargo, se ha observado que sufren un elevado sangrado, que permiten temperaturas máximas bajas ^(4,50) y que con ellas persisten los problemas de co-elución de los PCDD/Fs, aportando una separación incompleta de los 17 congéneres más tóxicos de este grupo, cuya monitorización viene recomendada por la legislación actual ^(4,49). En algunos estudios se ha indicado que para lograr la completa separación de estos 17 PCDD/Fs debería usarse una combinación de fases estacionarias apolares y

polares (por ejemplo, DB-5 y DB-225; DB-5MS y SP-2331 (90 % bis-cianopropil -10% fenil cianopropilsiloxano)) (49).

La GC × GC (29,51) puede proporcionar también una mejora de la resolución cromatográfica, sensibilidad y selectividad, así como una reducción en el tiempo de análisis en comparación con la GC convencional (51). Brevemente, la técnica de GC × GC consiste en una primera separación usando una columna apolar (separación basada en la volatilidad) y en una segunda separación utilizando un columna más polar (separación basada en la polaridad), permitiendo mejores separaciones entre compuestos que co-eluyen (29,51). Sin embargo, la optimización de la separación mediante GC × GC resulta más laboriosa que la de la GC tradicional, y los cromatogramas obtenidos son notablemente más complejos, necesiándose herramientas de software más potentes. Por ejemplo, GC × GC se ha aplicado al análisis de mezclas complejas de POPs, tales como PCDD/Fs y (*dl*-) PCBs, PBDEs en muestras medioambientales (51) y de OCPs en agua de río (29).

Con respecto a la inyección, la técnica más comúnmente empleada es la de *splitless* o sin división (37,38) (**Tablas 3.1 y 3.2**). No obstante, para mejorar los LODs también se han aplicado técnicas alternativas basadas en LVI, tales como la inyección en columna o la PTV (4,31). En el caso específico de la separación de los PBDEs, se recomienda usar PTV para evitar la degradación de los congéneres termolábiles. Cuando se usa el inyector en modo *split/splitless*, es necesario ajustar correctamente la temperatura de la inyección para evitar la discriminación de los BDEs con menos átomos de bromo (bromados inferiores) y la degradación de los que más tienen (bromados superiores) (36). Además, se ha desarrollado un nuevo sistema de datos duales que involucra dos GC

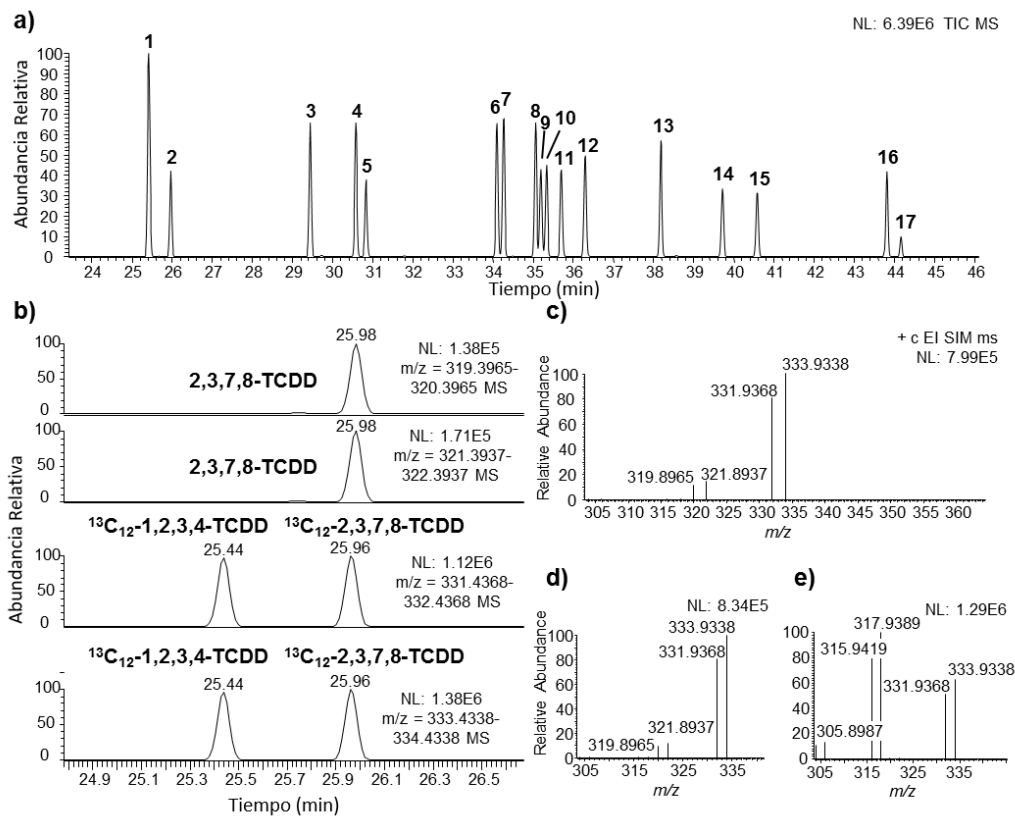


Figura 3.5. (a) Separación cromatográfica típica (cromatograma total de iones) de los 17 congéneres más tóxicos de los PCDD/Fs a 0,5 ng/mL (1 ng/mL para OCDD y OCDF) mediante GC-HRMS (resolución 10000, 10% definición de valle; inyección splitless, 1 μ L; columna TR-DIOXIN-5MS (60 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m)). Identificación de los picos: (1) 2,3,7,8-TCDF; (2) 2,3,7,8-TCDD; (3,4) penta-CDFs; (5) 1,2,3,7,8-penta-CDD; (6) hexa-CDFs (6,7,8,12); (9,10,11) hexa-CDDs; (13,15) hepta-CDFs; (14) 1,2,3,4,6,7,8-hepta-CDD; (16) OCDD; (17) OCDF; (b) cromatogramas extraídos de la TCDD nativa y marcada; (c) espectro de masas del congénere nativo de 2,3,7,8-TCDD; (d) espectro de masas de 1,2,3,4-TCDD marcada con ¹³C y (e) nativa 1,2,3,4-TCDD.

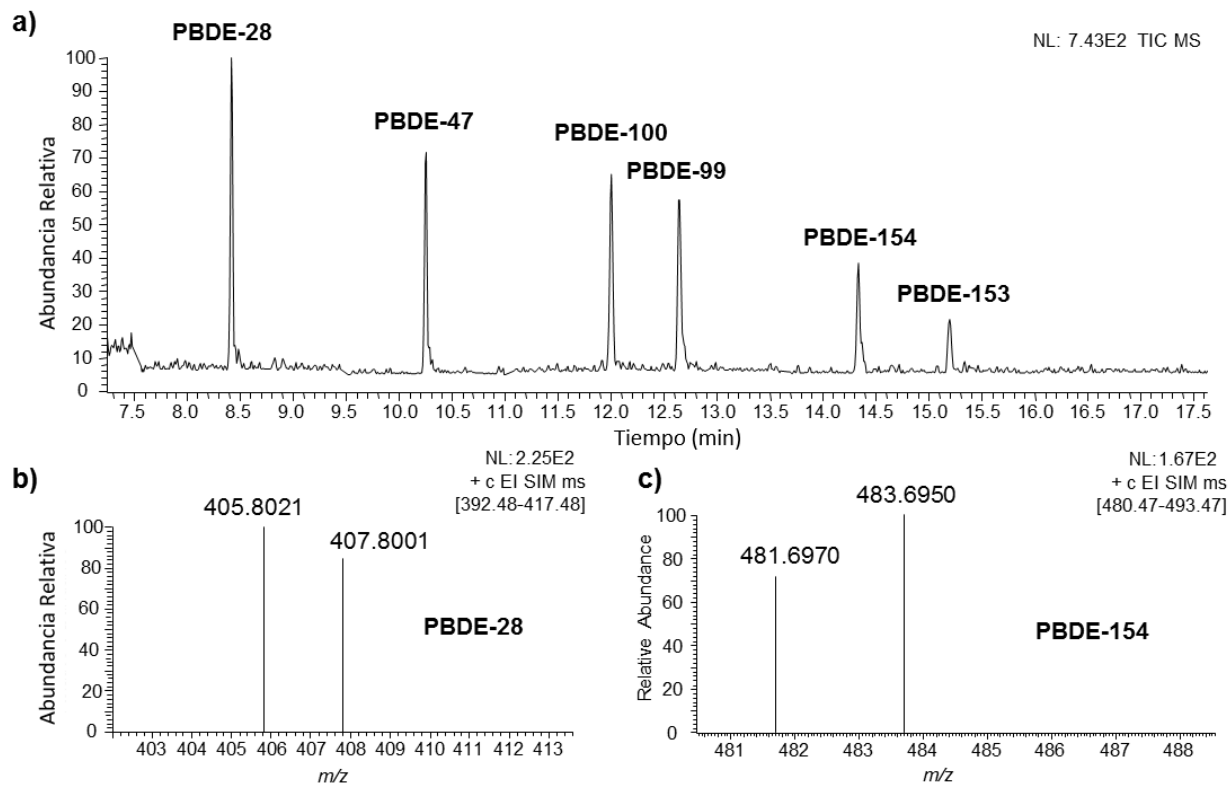


Figura 3.6. (a) Cromatograma total de iones (TIC) de una muestra que contiene PBDEs (0,1 $\mu\text{g/L}$) mediante GC-HRMS (resolución 10000, 10% de definición de valle; inyección en modo splitless, 1 μL ; columna TR-5MS (30 m \times 0,25 mm \times 0,1 μm); (b) espectro de masas de PBDE-28 (PBDE bromado bajo), y (c) PBDE-154 (PBDE bromado alto).

acoplados a un HRMS capaz de analizar iones de ambos GC simultáneamente, aunque las aplicaciones son escasas ⁽³¹⁾.

GC-HRMS es una poderosa herramienta analítica que, caracterizada por la resolución y exactitud de masa, sensibilidad, selectividad, especificidad y robustez, resulta especialmente útil para la determinación de POPs, incluso a niveles ultratraza ⁽³¹⁾. Ha sido aplicada tanto en análisis de compuesto objetivo (por ejemplo, PCDD/Fs) como en aplicaciones alternativas de monitorización de contaminantes no objetivo o desconocidos ^(29,31).

Actualmente, la GC-HRMS es, sin duda alguna, considerada como la técnica instrumental de referencia para el análisis de los PCDD/Fs y *dl*-PCBs ⁽⁴⁹⁾, aunque se puedan usar otras técnicas de detección para este propósito. De hecho, la determinación de estos compuestos, PCDD/Fs y *dl*-PCBs, es la principal aplicación de la GC-HRMS. Por el contrario, en el caso del resto de POPs (especialmente en el caso de los OCPs y en algunas ocasiones, los PCBs), se usan con frecuencia otras técnicas de detección, como ECD o LRMS. No obstante, si se requiere un alto poder de resolución se recomienda también la HRMS. En este contexto, recientemente se han publicado varios estudios focalizados en aplicaciones y estrategias/tendencias para el análisis de POPs por HRMS en el campo medioambiental ^(38,41,44,49).

La GC-HRMS basada en instrumentos de sector magnético es la tendencia predominante en el análisis de dioxinas ⁽⁴⁹⁾, ya que aportan la resolución y sensibilidad necesarias ⁽³¹⁾ y es la técnica de referencia para el análisis de PCDD/Fs en el Método de la EPA 1613 ⁽³⁵⁾ (**Figura 3.5**). En términos generales, los POPs se analizan mediante GC-HRMS a una resolución de 10000 (10% de definición de valle), usando EI y SIM de los dos iones más abundantes del clúster (incluidos los iones marcados

isotópicamente) ^(38,44,49). Sin embargo, analizando PBDEs con EI pueden encontrarse interferencias potenciales de otros compuestos clorados (por ejemplo, PCBs). Por ejemplo, las masas nominales correspondientes a iones monitorizados para di-BDEs y penta-CBs son idénticas (m/z 326), de modo que se necesitaría un poder de resolución extremadamente alto de 24000 para poder separarlos ⁽³⁶⁾. Y a pesar de que los espectrómetros de masas modernos de doble enfoque son capaces de alcanzar valores elevados de resolución, al hacerlo se observa una pérdida de sensibilidad destacable.

Debido a que los instrumentos de sector magnético requieren una elevada inversión económica, alto coste de mantenimiento y operadores altamente cualificados ⁽³¹⁾, se han estado usando técnicas alternativas, como es el caso de TOF. Actualmente, están disponibles dos tipos de instrumentos GC-TOF-MS: (i) instrumentos de HRTOF-MS, que pueden alcanzar una resolución de masa de 7000 (anchura total a una definición media máxima, FWHM), exactitud de masa tan baja como 5 ppm, velocidad de adquisición moderada (velocidad máxima de adquisición máxima de 20 s⁻¹) y rango lineal de aproximadamente tres órdenes de magnitud; e (ii) instrumentos TOF-MS de alta velocidad (HSTOF-MS), con una velocidad máxima de adquisición de 500 s⁻¹, una resolución de masa de la unidad y una linealidad de aproximadamente cuatro órdenes de magnitud. Estos instrumentos de HSTOF-MS se han empleado frecuentemente de forma conjunta con la GC rápida y ultra rápida o GC × GC ⁽³¹⁾. Por otro lado, los instrumentos de GC-HRTOF-MS se han aplicado en análisis cualitativo, particularmente con propósitos de *screening* y elucidación de desconocidos ^(29,31), y para el análisis de POPs en agua, incluyendo análisis de compuestos objetivo y análisis retrospectivo para probar la presencia de PBDEs y otros

compuestos mediante examen de los datos precisos de MS de barrido completo o *full-scan* (39).

Recientemente, la técnica de ionización APCI acoplada a GC se ha usado para cribado o *screening* de contaminantes orgánicos en muestras acuosas. Con esta técnica se obtienen espectros menos fragmentados, pudiéndose normalmente observar el ion molecular. En este estudio se usó un GC-HRTOF-MS equipado con un cuadrupolo híbrido-TOF-MS (QTOF-MS). A fin de llevar a cabo la identificación inequívoca de los compuestos (31), se ejecutaron experimentos MS/MS y la reinyección de la muestra usando EI (para obtener fragmentos de iones con el objetivo de confirmar la estructura).

2.4. APLICACIONES Y ESTRATEGIAS DE CUANTIFICACIÓN

En lo que respecta a garantizar la calidad en el análisis de los POPs, es necesario el uso de patrones analíticos y estándares internos de alta calidad, ensayos de blancos, réplicas de los análisis, experimentos de recuperación y gráficos de control, así como la participación en ensayos de aptitud (interlaboratorios), análisis de materiales de referencia certificados (CRM) y materiales de referencia de laboratorio (4). Además, la técnica de la dilución isotópica basada en el uso de estándares internos marcados con ^{13}C permite la cuantificación precisa para la correcta determinación de los POPs (35). Estos estándares se añaden en una cantidad conocida al inicio de la extracción y limpieza, permitiendo la corrección de la recuperación a lo largo de las múltiples etapas de las metodologías de limpieza, actuando también como marcadores para llevar cabo la identificación de los analitos nativos presentes en la muestras (35,50). Por ejemplo, en el caso de los PCDD/Fs y *dl*-PCBs, para cada congénere individual se calcula el factor de respuesta relativa con las soluciones de estándar de calibración

correspondientes, conteniendo tanto los compuestos nativos como los marcados ⁽³⁵⁾.

Adicionalmente, para poder determinar la exposición animal y humana a la ingesta de PCDD/Fs y *dl*-PCBs, se han asignado los factores de equivalencia tóxica individuales (TEFs) de acuerdo a su potencia relativa en comparación con la dioxina más tóxica, la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD; TEF = 1) ⁽⁵²⁾. En este sentido, la toxicidad de una mezcla se expresa en términos de equivalentes tóxicos internacionales, TEQ (equivalentes de TCDD), que se define como la suma de la concentración de los congéneres individuales multiplicada por sus valores de TEF ⁽⁵⁰⁾.

Debido a que los sedimentos son importantes depósitos ambientales de POPs, y con el objetivo de evaluar la descarga de estos contaminantes al medio ambiente, durante los últimos años se ha tratado de llevar un seguimiento y de informar de la distribución espacial y temporal de los POPs en los sedimentos. Varios de estos estudios se citan a continuación; se han determinado PCBs y PCDD/Fs en sedimentos en el río Nilo (Egipto), obteniendo concentraciones medias que varían de 1461 a 2244 pg/g (PCBs) y 240 a 775 pg/g (PCDD/Fs), revelando una disminución en las concentraciones a las que estos contaminantes están presentes ⁽⁴⁵⁾. Los PBDEs han sido también estimados en sedimentos de varias localizaciones costeras en Corea, detectándose 20 congéneres en todas las muestras en un rango de concentración de 0,45-494 ng/g, observándose mayores concentraciones cerca de complejos industriales y puertos grandes, y demostrando así que las actividades humanas contribuyen a la contaminación por PBDEs. Adicionalmente, se encontraron principalmente deca-BDEs (>90% de la concentración total de PBDEs) ⁽⁴²⁾. Asimismo, se han evaluado los niveles de POPs en

sedimentos de río Han (Corea del Sur) ⁽⁴¹⁾. En este caso se detectaron DDTs, HCB, *dl*-PCBs y PCDD/Fs a concentraciones de 1,05-8,94 µg/kg, 0,49-3,73 µg/kg, 41,5-4,53 ng/kg y 23,10-368 ng/kg, respectivamente. Análogamente, se han analizado PCDD/Fs y *dl*-PCBs en sedimentos marinos procedentes de la costa española del Atlántico norte ⁽¹⁴⁾. Todos los congéneres de PCBs estudiados se detectaron en la totalidad de las muestras analizadas, demostrando su ubicuidad en los sedimentos costeros. Los niveles de los PCBs marcados fueron detectados en el rango de 385,5-4060,9 pg/g. Los PCDD/Fs y los *dl*-PCBs se obtuvieron en el rango de 0,08-0,52 pg WHO-TEQ/g, predominando los PCDDs frente a los PCDFs, y siendo OCDD el compuesto más abundante ⁽¹⁴⁾. Por otro lado, también se han llevado a cabo estudios de los niveles de POPs en muestras de agua, pero a una menor extensión. Así, se han monitorizado PCDD/Fs y PCBs en aguas recolectadas de “la Presa de las Tres Gargantas” (China), mostrando con promedio total de PCDD/Fs + PCBs de 0,066 pg/L WHO-TEQ. Dentro de las dioxinas, se encontraron principalmente hepta- y octa-cloradas CDD/Fs ⁽³⁸⁾. Posteriormente, en 2008, se determinó en el mismo lugar, y también en muestras acuosas, un contenido total de PCBs y OCPs de 0,08-0,51 ng/L y 2,33-3,60 ng/L, respectivamente ⁽⁴⁰⁾.

2.5. CONCLUSIONES

La presencia de los POPs en los ecosistemas acuáticos y su determinación en muestras ambientales es un tema importante que ha suscitado una preocupación creciente durante muchos años, debido al potencial riesgo que estos contaminantes suponen sobre la salud humana, su persistencia, y su tendencia a la bioacumulación. Debido a su carácter hidrofóbico, los POPs tienden a asociarse a las partículas de los sistemas acuáticos y posteriormente, a depositarse en el fondo vía

procesos de sedimentación. Esta es la razón por la que los sedimentos son analizados con mayor frecuencia que las muestras de agua. Así, las muestras de agua y los sedimentos pertenecen a un grupo de muestras medioambientales en la cuales los POPs están presentes a niveles de concentración extremadamente bajos, haciendo necesaria la aplicación de procedimientos de extracción con factores de enriquecimiento altamente eficientes y de rigurosos métodos de limpieza para una determinación fiable. En este contexto, el desarrollo de métodos de preparación de muestra potentes, automatizables y miniaturizados con bajo consumo de disolventes, ha sido un desafío perpetuo. Para la determinación instrumental final normalmente se usa GC-MS, y más específicamente CG-HRMS. Esta técnica usando sector magnético es considerada de hecho la técnica de referencia para la determinación de algunos POPs (por ejemplo, PCDD/Fs). Adicionalmente, la aplicación de analizadores de TOF ha captado considerable atención, ya sean sistemas de HRTOF-MS (usados con propósitos de cribado o elucidación de desconocidos) o HSTOF-MS (útiles junto con GC×GC). En resumen, a lo largo de los últimos años ha tenido lugar un destacable desarrollo en analizadores de masas de alta resolución, lo que ha permitido la mejora de las estrategias analíticas focalizadas en análisis medioambiental. Y sin duda alguna, esta mejora y evolución de los instrumentos continuará en el futuro a fin de conseguir una combinación prometedora entre el análisis cualitativo y cuantitativo y la elucidación estructural de compuestos desconocidos usando un solo instrumento, además de un incremento en sensibilidad.

2.6. REFERENCIAS

- ¹ M.R. Moore, W. Vetter, C. Gaus, G.R. Shaw, J.F. Müller, *Mar. Pollut. Bull.*, 45: 62–68, 2002.
- ² A.G. Smith, S. D. Gangolli, *Food Chem. Toxicol.*, 40: 767–779, 2002.
- ³ A. Mechlińska, L. Wolska, J. Namieśnik, *Trends Anal. Chem.*, 29: 820–831, 2010.
- ⁴ S.P.J. van Leeuwen, J. de Boer, *J. Chromatogr. A*, 1186: 161–182, 2008.
- ⁵ Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, *Off. J. Eur. Union*, L209:3. Available on <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2006/1209/120920060731en00030029.pdf>.
- ⁶ Stockholm convection website: <http://chm.pops.int/default.aspx> (last accessed May 2013).
- ⁷ Environmental Protection Agency (EPA) website: <http://www.epa.ie/whatwedo/resource/hazardous/pops/> (last accessed May 2013).
- ⁸ J.H. Ju, I.S. Lee, W.J. Sim, H. Eun, J.E. Oh, *Chemosphere*, 74: 441–447, 2009.
- ⁹ A. Oren, Z. Aizenshtat, B. Chefetz, *Environ. Pollut.*, 141: 265–274, 2006.
- ¹⁰ www.epa.gov (last accessed May 2013).
- ¹¹ Y.S. Kim, H. Eun, T. Katase, H. Fujiwara, *Chemosphere*, 67: 456–463, 2007.
- ¹² <http://www.chem.unep.ch/pops/> (last accessed May 2013).
- ¹³ O.S. Okay, B. Karacık, S. Başak, B. Henkelmann, S. Bernhöft, K.W. Schramm, *Chemosphere*, 76: 159–166, 2009.
- ¹⁴ S.G. Lavín, D. Gorri, A. Irabien, *Water, Air, Soil Pollut.*, 221: 287–299, 2011.
- ¹⁵ J. Liebens, C. J. Mohrherr, N.K.K.-Renier, R.A. Snyder, K.R. Rao, *Water, Air, Soil Pollut.*, 222: 403–419, 2011.
- ¹⁶ J.S. Richert, Z. Usydus, A. Drgas, *J. Environ. Monitor.*, 14: 2100–2107, 2012.
- ¹⁷ M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J. López de Alda, D. Barceló, *J. Chromatogr. A*, 974: 23–51, 2002.
- ¹⁸ <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v48je20.htm#2.2> (last accessed May 2013).
- ¹⁹ WHO's International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 69. Available on <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol69/volume69.pdf>. (Last accessed May 2013).
- ²⁰ F.X. Rolaf van Leeuwen, M. Feeley, D. Schrenk, J.C. Larsen, W. Farland, M. Younes, *Chemosphere*, 40: 1095–1101, 2000.
- ²¹ H.B. Moon, M. Choi, H.G. Choi, G. Ok, K. Kannan, *Chemosphere*, 75: 565–571, 2009.
- ²² M. Verta, S. Salo, M. Korhonen, T. Assmuth, H. Kiviranta, J. Koistinen, P. Ruokojärvi, P. Isoaari, P.-A. Bergqvist, M. Tysklind, I. Cato, J. Vikelsøe, M.M. Larsen, *Chemosphere*, 67: 1762–1775, 2007.
- ²³ J.de Boer, H. Leslie, S.P.J. van Leeuwen, J.-W. Wegener, B. van Bavel, G. Lindström, N. Lahoutifard, H. Fiedler, *Anal. Chim. Acta*, 617: 208–215, 2008.
- ²⁴ Commission Regulation (EU) No 756/2010, L223: 20, 2010. Available on: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:223:0020:0028:EN:PDF> (last accessed May 2013).

- ²⁵ Commission Regulation (EU) No 519/2012, *Off. J. Eur. Union*, L159: 1, 2012.
- ²⁶ Regulation (EU) No 757/2010 *Off. J. Eur. Union*, L223: 29, 2010.
- ²⁷ Regulation (EC) No 850/2004, *Off. J. Eur. Union*, L158: 7, 2004. Available on: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri_OJ:L:2004:158:0007:0049:EN:P DF (last accessed May 2013).
- ²⁸ Directive 2008/105/EC, *Off. J. Eur. Union*, L348: 84, 2008.
- ²⁹ N. Ochiai, T. Ieda, K. Sasamoto, Y. Takazawa, S. Hashimoto, A. Fushimi, K. Tanabe, *J. Chromatogr. A*, 1218: 6851–6860, 2011.
- ³⁰ H. Liu, Q. Zhang, Z. Cai, A. Li, Y. Wang, G. Jiang, *Anal. Chim. Acta*, 557: 314–320, 2006.
- ³¹ F. Hernández, J.V. Sancho, M. Ibáñez, E. Abad, T. Portolés, L. Mattioli, *Anal. Bioanal. Chem.*, 403: 1251–1264, 2012.
- ³² J. de Vos, F. G.-Allman, E. Rohwer, *J. Chromatogr. A*, 1218: 3282–3290, 2011.
- ³³ E. Eljarrat, M. A. Martínez, P. Sanz, M. A. Concejero, B. Piña, L. Quirós, D. Raldúa, D. Barceló, *Chemosphere*, 71: 1156–1161, 2008.
- ³⁴ Y. Picó (Ed.), *Food Toxicants Analysis*. Chapter 9, S. Bogialli, A. Di Corcia, M. Nazzari, Extraction procedures, Elsevier B. V., 2007.
- ³⁵ US EPA (1994) Method 1613, Revision B, EPA 821-B94-0059. Office of Water, US EPA, Washington, DC. Available on: <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/organics/dioxins/index.cfm> (last accessed May 2013).
- ³⁶ I. Fulara, M. Czaplicka, *J. Sep. Sci.*, 35: 2075–2087, 2012.
- ³⁷ F. Hernández, T. Portolés, M. Ibáñez, M.C. Bustos-López, R. Díaz, A. M. Botero-Coy, C.L. Fuentes, G. Peñuela, *Sci. Total Environ.*, 439: 249–259, 2012.
- ³⁸ J. Chen, J. Luo, Z. Qiu, C. Xu, Y. Huang, Y. Jin, N. Saito, T. Yoshida, K. Ozawa, J. Cao, W. Shu, *Chemosphere*, 70: 1545–1551, 2008.
- ³⁹ F. Hernández, T. Portolés, E. Pitarch, F. J. López, *Anal. Chem.*, 79: 9494–9504, 2007.
- ⁴⁰ J. Wang, Y. Bi, G. Pfister, B. Henkelmann, K. Zhu, K.-W. Schramm, *Chemosphere*, 75: 1119–1127, 2009.
- ⁴¹ K.S. Kim, S.C. Lee, K.H. Kim, W.J. Shim, S.H. Hong, K.H. Choi, J.H. Yoon, J.G. Kim, *Chemosphere*, 75: 580–587, 2009.
- ⁴² H.B. Moon, K. Kannan, S.J. Lee, M. Choi, *Chemosphere*, 66: 243–251, 2007.
- ⁴³ M. Numata, T. Yarita, Y. Aoyagi, M. Yamazaki, A. Takatsu, *Chemosphere*, 58: 865–875, 2005.
- ⁴⁴ E. Spinnel, C. Danielsson, P. Haglund, *Anal. Bioanal. Chem.*, 390: 411–417, 2008.
- ⁴⁵ X. Zhao, H. Zhang, J. Fan, D. Guan, H. Zhao, Y. Ni, Y. Li, J. Chen, *Mar. Pollut. Bull.*, 62: 918–925, 2011.
- ⁴⁶ A. A. El-Kady, M. A. Abdel-Wahhab, B. Henkelmann, M. H. Belal, M. K.S. Morsi, S. M. Galal, K.-W. Schramm, *Chemosphere*, 68: 1660–1668, 2007.
- ⁴⁷ V.N. Fishman, G.D. Martin, L.L. Lamparski, *J. Chromatogr. A*, 1139: 285–300, 2007.
- ⁴⁸ E.J. Reiner, R.E. Clement, A.B. Okey, C.H. Marvin, *Anal. Bioanal. Chem.*, 386: 791–806, 2006.

⁴⁹ P. Korytár, P. Haglund, J. de Boer, U.A.Th. Brinkman, *Trends Anal. Chem.*, 25: 373–396, 2006.

⁵⁰ M.V. den Berg, L. S. Birnbaum, M. Denison, M. De Vito, W. Farland, M. Feeley, H. Fiedler, H. Hakansson, A. Hanberg, L. Haws, M. Rose, S. Safe, D. Schrenk, C. Tohyama, A. Tritscher, J. Tuomisto, M. Tysklind, N. Walker, R.E. Peterson, *Toxicol. Sci.*, 93: 223–241, 2006. Document available on: http://www.who.int/foodsafety/chem/2005_WHO_TEFs_ToxSci_2006.pdf (last accessed May 2013).

⁵¹ M. Nunes, P. Marchand, A. Vernisseau, B. Le Bizec, F. Ramos, M.A. Pardal, *Chemosphere*, 83: 1345–1352, 2011.

⁵² J.F. Focant, G. Eppe, C. Pirard, E. De Pauw, *J. Chromatogr. A*, 925: 207–221, 2001.

3. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO MEDIANTE GC-MS/MS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS PRIORITARIOS EN DIFERENTES TIPOS DE AGUA

Resumen

Se ha desarrollado un método analítico sensible para la determinación de PAHs en agua, incluyendo contaminantes prioritarios de acuerdo a la UE, mediante GC-QqQ-MS/MS. El tratamiento de la muestra se basó en un método de SPE que fue validado en cuatro tipos diferentes de agua: mar, consumo, continental no tratada y residual, de acuerdo a la Decisión de la Comisión 2002/657/CE y la guía SANTE 11813/2017. Los valores de recuperación obtenidos, estudiados a tres niveles de concentración (1,7, 5,6 y 25 ng/L), oscilaban en el rango de 77-108%. Los valores de precisión fueron $\leq 17\%$ y 22% para precisión intra- e inter-día, respectivamente. La linealidad se estudió en el rango de 1,4-100 ng/L, obteniéndose coeficientes de determinación ($R^2 \geq 0,9962$). Los LODs se encontraban en el rango de 1 a 3 ng/L, mientras que los LOQs se establecieron de 1,4 a 5 ng/L. El método validado fue satisfactoriamente acreditado de acuerdo a la norma internacional ISO/IEC 17025 (incluyendo el cálculo de incertidumbre) y aplicado al análisis en rutina de muestras reales de agua.

3.1. INTRODUCCIÓN

La contaminación química de las aguas medioambientales representa un preocupante problema de importancia global (1-3). Ésta implica un riesgo para los organismos acuáticos y en consecuencia, para la salud humana, ya que estos contaminantes químicos pueden bioacumularse en el ecosistema (3,4). Entre los contaminantes orgánicos que pueden

estar presentes en agua, los PAHs son de particular relevancia debido a su ubicuidad, persistencia y toxicidad (2); algunos de ellos pueden ser encontrados en el medioambiente en cantidades considerables (5). Los PAHs (6) se forman durante la combustión incompleta de materiales que contienen carbono (5,6). Estos compuestos pueden ingresar en el medio acuático procedentes de fuentes industriales y astilleros, depósitos atmosféricos, derrames de petróleo y escorrentía urbana (2,7,8), pudiendo estar expuestos los humanos a estos contaminantes también a través del agua potable (5).

Con respecto a su potencial toxicidad, el comité experto de FAO/OMS en aditivos alimentarios (JECFA) (9) y la agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC) (10), han demostrado el carácter carcinogénico y mutagénico de algunos de ellos, mientras que otros pueden actuar como sinergistas (5,9). La US-EPA ha propuesto una lista de contaminantes orgánicos prioritarios debido a su elevada toxicidad (11), del mismo modo que ha establecido límites de tolerancia en el rango de 100-300 ng/L en agua (12). Otros PAHs (NPH, ANT, FA, BaP, BbFA, BghiP, BkFA, e IP) han sido clasificados como sustancias prioritarias en el campo de la política de aguas de la UE mediante la Directiva 2013/39/CE (4), que modifica la Directiva 2008/105/CE (13). Adicionalmente, la UE ha fijado límites promedio anuales muy restrictivos para estos compuestos en aguas superficiales continentales y otras aguas superficiales (4). De igual modo, a fin de asegurar los criterios de calidad del agua potable, y por tanto, la seguridad del consumidor, se establecieron límites máximos específicos para PAHs mediante la Directiva sobre agua potable (14), para BaP (0,01 µg/L), y para la suma de BbFA, BkFA, BghiP e IP (0,10 µg/L).

En consecuencia, se requieren métodos sensibles para la determinación de los PAHs establecidos como prioritarios en agua. Debido a la naturaleza hidrofóbica de estos compuestos (especialmente los PAHs “pesados”), normalmente están presentes a bajas concentraciones en matrices acuosas. Por tanto, es necesario desarrollar métodos de extracción eficientes, que incluyan una etapa de pre-concentración en combinación con técnicas instrumentales potentes, para conseguir la sensibilidad y selectividad requeridas (7,8). En este sentido, la SPE ha sido la técnica preferida para la extracción de PAHs en muestras acuosas a lo largo de los años, debido a sus ventajas, tales como alto factor de enriquecimiento, alta recuperación, simplicidad y reducción de efecto matriz de la muestra (1,2,7,15-17). También se han aplicado otras técnicas de extracción miniaturizadas recientes, tales como SPME (17-21), LPME (22), DLLME (23), SBSE (24,25) o incluso una combinación entre DLLME y SBSE (26). A pesar de los comentados beneficios, estos métodos de extracción miniaturizados pueden resultar en un consumo elevado de tiempo o la necesidad de una mayor formación del personal implicado, por lo que, en este caso, SPE es la opción más útil.

LC-MS es la técnica más empleada para la determinación de PAHs en muestras de agua (1,2,8,27), aunque también han sido utilizados instrumentos de GC-HRMS de sector magnético (18,20). No obstante, la obtención de una resolución adecuada puede llegar a ser un punto crítico ya que existen varios grupos de compuestos que pueden co-eluir, haciendo necesario el uso de columnas específicas (28).

El objetivo de este estudio fue el desarrollo y validación de un método analítico sensible para la determinación de 12 PAHs, algunos de ellos clasificados como contaminantes prioritarios reconocidos por la UE y también por la US-EPA. El método se validó en los principales tipos de

agua (residual, de mar, continental no tratada y potable) mediante GC-MS/MS, aplicando una etapa de SPE para conseguir límites bajos conformes con la legislación actual, y cumpliendo todos los requisitos de calidad necesarios para ser satisfactoriamente acreditado mediante la norma internacional ISO/IEC 17025:2017 (29).

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Materiales y reactivos

Las disoluciones patrón individuales (10 mg/L) de 5-metilcriseno (MCH) (99,8%), B_jFA (98,5%), y benzo[*c*]fluoreno (BcL) (98,2%), se obtuvieron de Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburgo, Alemania). Fluoranteno-d₁₀ (FA-d₁₀) (99%), usado como IS, fue adquirido de Supelco (Bellefonte, PA, US). Una disolución de PAH-Mix9 (10 mg/L de cada analito, ≥97%), de ANT, benzo[*a*]antraceno (BaA), B_bFA, B_kFA, B_{ghi}P, BaP, DBaH_A, FA e IP fue suministrada también por Dr. Ehrenstorfer GmbH. Se preparó una disolución patrón de trabajo multicompuesto (0,05 mg/L) mediante la adecuada dilución de cada disolución patrón primaria individual con acetato de etilo (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Se preparó también en acetato de etilo una disolución patrón de trabajo de FA-d₁₀ (2 mg/L) mediante dilución de la disolución primaria. Ambas disoluciones de trabajo se almacenaron bajo refrigeración (-20°C) durante un período máximo de 4 meses.

El hexano se compró de Sigma-Aldrich, y el ACN fue adquirido de J. T. Baker (Deventer, Los Países Bajos). Todos los disolventes orgánicos utilizados fueron de grado analítico (pureza en el rango de 98-99,8%). El agua ultrapura se obtuvo de un sistema de agua en Gradiente Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, US). Los cartuchos Sep-Pak (500 mg, 6 cm³) fueron suministrados por Waters (Milford, MA, US). Para filtrar se usaron filtros de membrana de nylon HNWP de Millipore

(Carrigtwohill, Country Cork, Irlanda). La evaporación de las muestras se llevó a cabo usando un rotavapor Büchi R-114 (Flawil, Suiza) y un concentrador de muestras de N₂ (Stuart, Stone, Staffordshire, Reino Unido) equipado con un calentador de bloque.

3.2.2 Instrumentación

Los análisis mediante GC-MS/MS se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo de gases modelo 3800 de Varian (Varian Instruments, Sunnyvale, CA, US) equipado con control de flujo electrónico. Las inyecciones se realizaron con un automuestreador CombiPal (CTC Analytics AG, Zwingen, Suiza) con una jeringa de 100 µL y un inyector *split/splitless* de temperatura programable SPI/1079, trabajando en modo LVI y PTV. Se usaron un *liner* ultra-inerte con fritado (3,4 mm, 5 unidades, Agilent, US) y una columna capilar Agilent Select PAH (30 m x 0,25 mm diámetro interno x 0,15 µm de espesor de película). El gas portador fue helio (99,9999%) a un flujo de 2 mL/min. El GC se interconectó a un MS de triple cuadrupolo (QqQ) operando en modo EI a 70 eV y con una corriente de emisión programada de 50 µA. Como gas de colisión se empleó Argón (99,999%). El control del equipo, la adquisición de datos y los análisis se llevaron a cabo usando el software de MS Workstation (versión 7.0). Las extracciones mediante SPE se realizaron con un colector de SPE suministrado por Waters.

3.2.3 Procedimiento de extracción de muestra

El método de extracción se adaptó de una metodología previamente descrita (17). Se añadieron 75 mL de ACN a las muestras de agua filtradas (250 mL) para evitar la adsorción de los PAHs en la superficie del vidrio y mejorar la retención de los compuestos en los cartuchos C18. Posteriormente, se fortificaron a tres niveles: 1,7, 5,6 y 25 ng/L. Los

cartuchos C18 fueron acondicionados con 5 mL de ACN y 10 mL de agua ultrapura. Después de esto, las muestras de agua se pasaron a través de los cartuchos mediante vacío a una velocidad de flujo máxima de 10 mL/min, y se secaron usando este vacío al menos durante 30 minutos. Los PAHs se eluyeron usando 8 mL de hexano, y el eluato fue evaporado hasta un volumen pequeño en un rotavapor (40°C) y hasta sequedad bajo una corriente de N₂. Finalmente, se llevó a cabo la redisolución del residuo añadiendo 975 µL de acetato de etilo y 25 µL de la disolución del IS.

3.2.4 Análisis mediante GC-QqQ-MS/MS

Se inyectaron alícuotas de 20 µL de muestra en el sistema GC operando a una velocidad de inyección del émbolo de 5 µL/s. El programa de temperatura del inyector fue el siguiente: 70°C (se mantuvo 0,5 min) → 352°C (200 °C/min, durante 20 min). La relación de división (*split*) del inyector se estableció inicialmente en 10:1. El modo sin división (*splitless*) se ajustó a 100:1 y se redujo a 30:1 a los 30 min. El programa del horno de columna fue: 70°C (durante 4 min) → 180°C (85°C/min) → 230°C (3°C/min, durante 7 min) → 280°C (28°C/min, durante 10 min) → 350°C (14°C/min, durante 3,5 min). Se aplicó enfriamiento criogénico con CO₂ en el inyector.

El MS de QqQ operó en modo SRM. Las temperaturas de la línea de transferencia, el dispositivo y la fuente de ionización se establecieron en 300, 40 y 280°C, respectivamente. Los valores óptimos de tiempo de escaneo oscilaron de 0,3 a 0,6 s. La anchura de pico fijada en el primer y tercer cuadrupolo fue de 2 y 1,5 *m/z*, respectivamente, con un retardo del filamento del multiplicador de 9,5 min. Las condiciones del MS optimizadas para todos los PAHs estudiados están recogidas en la **Tabla S1**.

3.2.5 Validación de la metodología

A fin de evaluar la fiabilidad del método y sus resultados, se llevó a cabo un procedimiento de validación exhaustivo conforme a las recomendaciones indicadas por la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE ⁽³⁰⁾ y la guía SANTE/11813/2017 ⁽³¹⁾. Adicionalmente, el protocolo de validación se diseñó con el objetivo de obtener la acreditación oficial de la Norma ISO/IEC 17028:2017. El método se evaluó de acuerdo a la identificación (en términos de RTW y relación de iones de las transiciones), selectividad/especificidad, linealidad, exactitud (en términos de veracidad y precisión), LODs y LOQs. En la **Tabla S2** aparece información más detallada sobre el modo de estimar los parámetros de validación, así como se describe su criterio de aceptación.

Adicionalmente, es importante mencionar que también se calculó la incertidumbre asociada al método analítico completo. Estos valores se estimaron usando una estrategia “de abajo hacia arriba” (*bottom-up*) basada en datos de la validación interna ^(32,33) a dos niveles de concentración (5,6 y 25 ng/L) para aguas de consumo y residual, y a tres niveles (1,7, 5,6 y 25 ng/L) para el resto de matrices acuosas. Teniendo en cuenta estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio ^(32,33), las principales fuentes de incertidumbre proceden de: los patrones y la preparación de las disoluciones patrón de trabajo, al igual que la incertidumbre asociada a la precisión, recuperación y calibración. La incertidumbre expandida se obtiene multiplicando la incertidumbre combinada por un factor k ($=2$), que proporciona un nivel de confianza aproximado del 95% ⁽³⁴⁾.

3.2.6. Muestras

Las muestras se obtuvieron de diversas localizaciones de la provincia de Almería (sureste de España): 10 muestras de agua de mar, 40 aguas de consumo, 10 aguas residuales y 20 muestras de aguas continentales no tratadas (**Tabla S3**). Todas estas muestras se tomaron en la primavera de 2017 usando botellas de vidrio, fueron filtradas a su llegada al laboratorio, excepto las aguas de consumo, y almacenadas a 4°C durante un período máximo de dos días hasta su análisis.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Optimización del análisis mediante GC-MS/MS

Teniendo en cuenta que hay algunos grupos de PAHs que co-eluyen y que presentan iones isobáricos, el factor clave durante la optimización de un método GC-MS/MS se basa en la selección de una fase estacionaria adecuada capaz de ofrecer una resolución cromatográfica completa, algo generalmente necesario para una adecuada cuantificación. Esto normalmente supone un incremento del tiempo de separación cromatográfica necesario. Una de las opciones más populares es la fase estacionaria apolar de 5% fenil-95% metil polisiloxano (por ejemplo, las típicas HP-5 o HP-5MS) ⁽⁶⁾. Sin embargo, debido a los problemas de co-elución, se han descrito cuantificaciones inadecuadas para los PAHs utilizando este tipo de columnas ^(8,9), por ejemplo para la separación de los tres isómeros críticos BbFA, BkFA y BjFA y el par DBahA e IP ⁽²⁸⁾.

En este estudio, se ha usado una columna de GC de Agilent Select PAH (descrita como selectiva para estos compuestos) a fin de solventar las limitaciones que presentan otras columnas. La **Figura 3.7** muestra la separación cromatográfica final obtenida para los PAHs estudiados. Se puede observar que el uso de esta columna y la aplicación de las

condiciones experimentales descritas en la **Sección 3.2.4** proporcionaron una separación y detección adecuadas de los compuestos analizados en un tiempo total de análisis de 49,25 min. En el caso particular de los isómeros benzo[*b,k,j*]fluoranteno, se consideró que la separación cromatográfica obtenida era la adecuada para llevar a cabo una cuantificación precisa. En este sentido, se utilizó la separación cromatográfica entre los isómeros BkFA y BjFA como referencia para evaluar la resolución. Así, se consideró adecuado un solapamiento $\leq 2/3$ con respecto a la altura de pico de ambos analitos. Es importante mencionar que para la cuantificación de estos compuestos se usó dicha altura de pico.

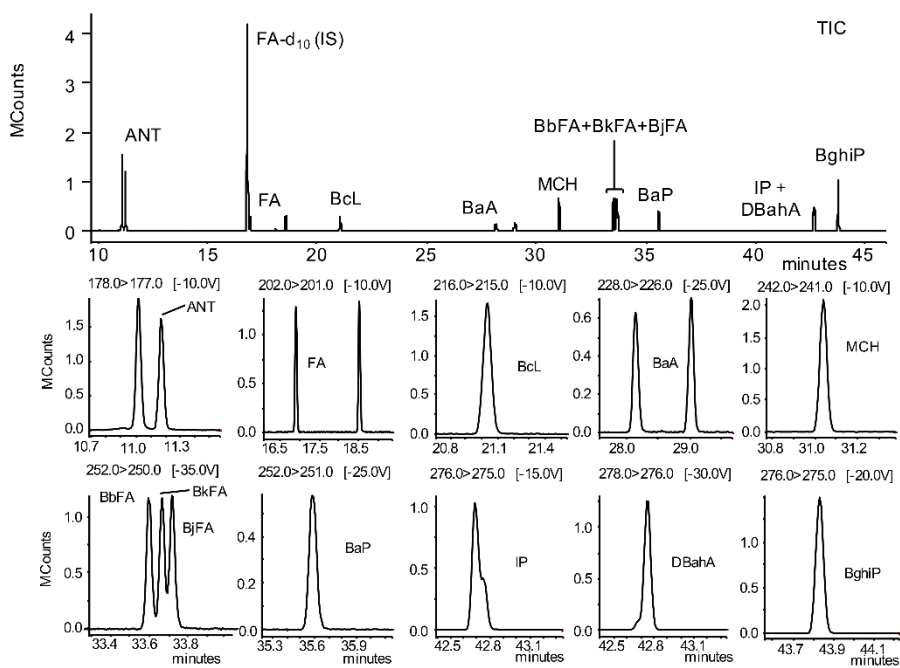


Figura 3.7. *Cromatograma total de iones (TIC) y cromatogramas mediante GC-QqQ-MS/MS obtenidos para cada PAH fortificando muestras de agua Milli-Q a 5ng/L.*

Y a pesar de que se detectó un problema de co-elución parcial para IP y DBahA (**Figura 3.7**), los picos pueden resolverse espectrométricamente, ya que ambos PAHs presentan diferentes transiciones SRM.

3.3.2. Validación de la metodología propuesta

Las características analíticas del método desarrollado aparecen resumidas en las **Tablas 3.3-3.4**. En lo que a la identificación concierne, los porcentajes de relación de iones relativa (ion de confirmación/cuantificación) de los PAHs analizados se calculó en los cuatro tipos diferentes de muestras de agua (**Tabla S3**). En términos generales, se asignó una tolerancia del 30% para todos los compuestos, que presentaron valores de relaciones de iones relativas comprendidas en el rango de 32-96% (**Tabla S2**).

En relación a la linealidad, se llevó a cabo un estudio de efecto matriz, no detectándose diferencias significativas en la cuantificación de los distintos tipos de aguas utilizando agua Milli-Q como matriz de referencia en el análisis en rutina. Se obtuvo una linealidad adecuada para todos los PAHs, con valores de R^2 entre 0,9962-0,9999 (**Tablas 3.3 y 3.4**) y una desviación $\leq \pm 20\%$ de los puntos individuales de la recta de calibrado.

En las **Tablas 3.3 y 3.4** se muestran los resultados calculados de veracidad y precisión. En general, se obtuvieron valores de RSD intra- e inter-día inferiores al 17 y 20%, respectivamente. Específicamente, los valores estimados de precisión intra-día se encontraban en el rango de 3-13% en agua de consumo, 2-9% en agua residual, 4-17% en agua de mar y 3-10% en agua continental no tratada. Análogamente, los valores obtenidos de RSD inter-día oscilaban entre 5-14% para agua de consumo, 6-16% para agua residual, 6-20% para agua de mar y 4-20%

Tabla 3.3. Resumen de los principales parámetros de validación del método optimizado en agua de consumo y residual.

PAHs	RTW (min)	Rango lineal (ng/L)	R ²	Recuperación (%) (RSD intra-día, %)		RSD inter-día (%)		Incertidumbre (%)		LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
				Concentración (ng/L)		Concentración (ng/L)		Concentración (ng/L)			
				5,6	25,0	5,6	25,0	5,6	25,0		
<i>Agua de consumo</i>											
ANT	11,42-11,54	5-100	0,9995	89 (13)	82 (4)	14	7	24	10	3	5
FA	17,33-17,55	5-100	0,9998	98 (6)	92 (4)	9	5	23	10	3	5
BcL	21,56-21,82	5-100	0,9999	94 (6)	93 (3)	7	6	21	10	3	5
BaA	29,12-29,29	5-100	0,9994	94 (7)	92 (3)	14	10	22	12	3	5
MCH	31,42-31,47	5-100	0,9990	99 (6)	93 (3)	10	5	16	9	3	5
BbFA	34,07-34,12	5-100	0,9991	98 (6)	93 (4)	11	6	19	10	3	5
BjFA	34,29-34,33	5-100	0,9987	99 (7)	93 (4)	12	7	22	11	3	5
BkFA	34,20-34,25	5-100	0,9988	96 (7)	94 (3)	11	5	20	9	3	5
BaP	36,32-36,36	5-100	0,9977	94 (6)	79 (5)	11	7	21	11	3	5
IP	43,22-43,29	5-100	0,9975	102 (8)	94 (5)	10	9	32	13	3	5
DBahA	43,26-43,34	5-100	0,9976	98 (8)	90 (6)	11	9	25	13	3	5
BghiP	44,26-44,33	5-100	0,9980	98 (7)	87 (5)	10	7	30	12	3	5
<i>Agua residual</i>											
ANT	11,10-11,28	5-100	0,9995	92 (9)	84 (4)	11	9	35	18	3	5
FA	16,82-17,09	5-100	0,9998	119 (5)	103 (2)	13	6	25	16	3	5
BcL	20,96-21,27	5-100	0,9999	86 (6)	99 (2)	16	12	27	19	3	5
BaA	28,31-28,64	5-100	0,9994	110 (4)	118 (3)	15	12	21	20	3	5
MCH	31,09-31,22	5-100	0,9990	103 (6)	102 (2)	12	11	25	19	3	5
BbFA	33,69-33,80	5-100	0,9991	110 (5)	120 (3)	11	10	20	19	3	5
BjFA	33,88-33,98	5-100	0,9987	104 (5)	120 (2)	11	8	20	17	3	5
BkFA	33,80-33,92	5-100	0,9988	113 (7)	120 (4)	14	13	31	21	3	5

PAHs	RTW (min)	Rango lineal (ng/L)	R ²	Recuperación (%) (RSD intra-día, %)		RSD inter-día (%)		Incertidumbre (%)		LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
				Concentración (ng/L)		Concentración (ng/L)		Concentración (ng/L)			
				5,6	25,0	5,6	25,0	5,6	25,0		
BaP	35,84-35,94	5-100	0,9977	89 (9)	105 (4)	16	15	34	21	3	5
IP	42,95-43,04	5-100	0,9975	87 (8)	103 (6)	15	13	23	21	3	5
DBahA	42,91-42,99	5-100	0,9976	85 (6)	91 (5)	12	11	25	19	3	5
BghiP	44,00-44,07	5-100	0,9980	84 (8)	94 (4)	15	13	21	19	3	5

Tabla 3.4. Resumen de los principales parámetros de validación del método optimizado en aguas de mar y continental no tratada.

PAHs	RTW (min)	Rango lineal (ng/L)	R ²	Recuperación (%) (RSD intra-día, %)			RSD inter-día (%)			Incertidumbre (%)			LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
				Concentración (ng/L)			Concentración (ng/L)			Concentración (ng/L)				
				1,7	5,6	25,0	1,7	5,6	25,0	1,7	5,6	25,0		
<i>Agua de mar</i>														
ANT	11,64-11,69	5-100	0,9996	NA ^a	87 (9)	94 (8)	NA	15	9	NA	30	19	3	5
FA	17,67-17,74	5-100	0,9995	NA	110 (14)	108(11)	NA	16	13	NA	35	26	3	5
BcL	21,95-22,01	5-100	0,9992	NA	104 (9)	118 (7)	NA	10	8	NA	33	20	3	5
BaA	29,52-29,57	5-100	0,9992	NA	108 (8)	113 (4)	NA	16	6	NA	34	17	3	5
MCH	31,61-31,69	5-100	0,9987	NA	93 (6)	104 (5)	NA	10	6	NA	30	18	3	5
BbFA	34,38-34,45	5-100	0,9997	NA	109 (12)	116 (6)	NA	20	7	NA	31	18	3	5
BjFA	34,51-34,58	5-100	0,9999	NA	110 (14)	116 (7)	NA	20	9	NA	30	19	3	5
BkFA	34,60-34,67	5-100	0,9999	NA	106 (13)	117 (4)	NA	18	7	NA	28	17	3	5
BaP	36,73-36,80	5-100	0,9994	NA	113 (17)	118 (9)	NA	20	15	NA	34	24	3	5
IP	43,49-43,55	1,4-100	0,9999	108 (13)	90 (12)	100 (5)	18	13	11	33	23	19	1	1,4
DBahA	43,53-43,59	5-100	0,9999	NA	89 (15)	98 (4)	NA	20	12	NA	35	19	3	5

PAHs	RTW (min)	Rango lineal (ng/L)	R ²	Recuperación (%) (RSD intra-día, %)			RSD inter-día (%)			Incertidumbre (%)			LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
				Concentración (ng/L)			Concentración (ng/L)			Concentración (ng/L)				
				1,7	5,6	25,0	1,7	5,6	25,0	1,7	5,6	25,0		
BghiP	44,49-44,55	1,4-100	0,9999	107 (13)	90 (5)	97 (4)	19	11	9	46	18	17	1	1,4
<i>Agua continental no tratada</i>														
ANT	11,64-11,84	5-100	0,9962	NA	112 (6)	90 (4)	NA	13	6	NA	21	17	3	5
FA	17,70-17,99	5-100	0,9971	NA	112 (10)	106 (9)	NA	19	10	NA	32	20	3	5
BcL	21,96-22,29	5-100	0,9991	NA	108 (4)	101 (3)	NA	10	6	NA	31	17	3	5
BaA	29,57-29,75	5-100	0,9996	NA	106 (4)	104 (3)	NA	15	5	NA	33	17	3	5
MCH	31,67-31,78	5-100	0,9991	NA	103 (5)	95 (4)	NA	13	7	NA	30	17	3	5
BbFA	34,46-34,56	5-100	0,9994	NA	116 (5)	113 (4)	NA	20	5	NA	35	17	3	5
BjFA	34,59-34,70	5-100	0,9992	NA	111 (5)	108 (3)	NA	20	4	NA	30	16	3	5
BkFA	34,69-34,79	5-100	0,9991	NA	113 (5)	110 (4)	NA	17	5	NA	23	17	3	5
BaP	36,84-36,93	5-100	0,9992	NA	105 (6)	107 (5)	NA	16	6	NA	27	18	3	5
IP	43,57-43,63	1,4-100	0,9999	79 (8)	101 (5)	107 (3)	16	15	5	30	20	16	1	1,4
DBahA	43,61-43,67	5-100	0,9998	NA	94 (5)	102 (4)	NA	16	8	NA	22	17	3	5
BghiP	44,55-44,61	1,4-100	0,9999	77 (7)	92 (5)	93 (4)	14	13	8	41	19	17	1	1,4

^aNA: no aplicable

en el caso de agua continental no tratada. Los valores de recuperación comprendían el intervalo de 79-120% (**Tablas 3.3 y 3.4**).

En particular, en agua de consumo se obtuvieron valores de 89-120% (a 5,6 ng/L) y de 79-94% (25 ng/L), valores de 84-119% (5,6 ng/L) y 84-120% (25 ng/L) en agua residual, 87-113% (5,6 ng/L) y 94-118% (25 ng/L) en agua de mar, y recuperaciones de 92-116% (5,6 ng/L) y 90-113% (25 ng/L) en agua continental no tratada. Adicionalmente, en agua de mar y agua continental no tratada, se calculó la recuperación a un nivel de fortificación de 1,7 ng/L para IP y BghiP, obteniéndose valores de 108% (IP) y 107% (BghiP) y de 79% (IP) y 77% (BghiP), respectivamente.

Para todos los PAHs estudiados se obtuvo un LOD de 3 ng/L (**Tablas 3.3 y 3.4**), excepto para IP y BghiP en aguas de mar y continental no tratadas, en las cuales se estimó un LOD de 1 ng/L (**Tabla 3.4**). Con respecto al LOQ, se estableció un valor de 5 ng/L en todos los casos excepto para IP y BghiP en aguas de mar y continentales no tratadas, en las cuales se fijó a 1,4 ng/L (**Tabla 3.4**). Estos dos compuestos mostraron una mayor sensibilidad con respecto al resto de PAHs, haciendo posible bajar a límites inferiores.

Estimación de la incertidumbre

Los valores de incertidumbre expandida (U) estimada se muestran en las **Tablas 3.3 y 3.4**. En resumen, para aguas de consumo y residuales, se obtuvieron incertidumbres inferiores al 30 y al 35% a un nivel de fortificación de 5,6 ng/L, e inferiores al 13 y 21% a 25 ng/L, respectivamente. Análogamente, en el caso de agua de mar y agua continental no tratada, se calcularon incertidumbres del 35% (a 5,6 ng/L) y de 26 y 20% (a 25 ng/L), respectivamente. Para IP y BghiP, en

particular en aguas de mar y agua continental no tratada a un nivel de 1,7 ng/L, se obtuvieron valores de 46 y 41%, respectivamente.

Comparación con otras metodologías existentes

Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, la mayoría de la bibliografía revisada no estima los valores de incertidumbre de sus métodos optimizados, al igual que tienden a usar columnas más genéricas válidas para un amplio rango de aplicaciones (24,26,27). No obstante, en nuestro estudio, se ha calculado la incertidumbre asociada al método analítico completo y se ha utilizado una fase estacionaria específica para conseguir una resolución cromatográfica completa y evitar problemas de co-elución.

En términos generales, aunque todos los estudios focalizados en el análisis en agua de los mismos PAHs analizados en este artículo presentan valores comparables en lo que a las recuperaciones obtenidas se refiere, se pueden observar ciertas diferencias en los LODs alcanzados (**Tabla 3.5**). Con respecto a los métodos de extracción usando SPE, se han obtenidos mejores LODs en el presente estudio que en el de *Ma y col.* (3,5-8,5 ng/L) (16) en muestras de agua medioambientales. En el estudio llevado a cabo por *Fu y col.* (27), se obtuvieron LODs considerablemente más altos para ANT y FA (35,9 y 9 ng/L, respectivamente) en aguas medioambientales.

Comparando nuestro estudio con métodos de extracción miniaturizados, el uso de la SPE como procedimiento de extracción ha permitido la obtención de resultados adecuados y comparables (o incluso mejores en algunos casos) que los obtenidos aplicando los primeros (**Tabla 3.5**). En este contexto, en el estudio de *Bianchin y col.* (21) en muestras de agua usando SPME se obtuvieron LODs más altos (170-320 ng/L). Por el contrario, *Chen y col.* (19) consiguieron LODs más bajos

Tabla 3.5. Resumen de la comparativa entre las metodologías existentes.

	<i>Ma y col.</i> [16]	<i>Fu y col.</i> [27]	<i>Bianchin y col.</i> [21]	<i>Chen y col.</i> [19]	<i>Tillner y col.</i> [35]	<i>Mollahosseini y col.</i> [24]	<i>Benedé y col.</i> [26]	<i>Presente estudio</i>
Análisis instrumental	GC-MS	GC-MS	GC-MS	GC-MS	GC-MS	GC-FID	GC-MS	GC-MS
Tipo de muestra	<i>Agua medioambiental</i>	<i>Agua medioambiental</i>	<i>Agua consumo y medioambiental</i>	<i>Agua residual</i>	<i>Agua consumo</i>	<i>Agua de residuos, fuentes y mar</i>	<i>Agua natural</i>	<i>Agua residual, consumo, mar y medioambiental</i>
Técnica extracción	SPE	SPE	SPME	SPME	SPME	SBSE	SBDLME	SPE
R (%)^a	70-127	72-134	60-120	70-125	82-111	86-100	84-115	77-108
Precisión (%)^b	1,2-12,1	0,8-9,5 (2,7-14,6)	0,6-24,9	3,1-12,5 (4,9-15,3)	5,0-28,0	6,0-10,0	4,1-9,8 (7,5-12,5)	2,0-17,0 (5,0-20,0)
LOD (ng/L)	2,0-8,5	9,0-35,9	170-320	0,10-0,73	N.D.	20-1100	0,5-8,7	1,0-3,0
LOQ (ng/L)	N.D. ^b	29,9-119,6	N.D.	N.D.	10 ng/L	60-330	1,7-28,7	1,4-5,0
U(%)^c	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	9,0-35,0

^a Recuperación; ^bValores de precisión inter-día entre paréntesis; ^bNo disponible; ^c Incertidumbre.

(0,10-0,73 ng/L) en agua utilizando también SPME. No obstante, el procedimiento analítico en este caso fue más tedioso y complejo que una SPME normal o una SPE, debido a que las fibras utilizadas (fibra recubierta de MIL-53 (Al, Cr, Fe)) exigen una preparación minuciosa⁽¹⁹⁾. Y *Tillner y col.* ⁽³⁵⁾ aplicaron un método de SPME y GC-MS optimizado para el análisis de PAHs en agua de consumo, aunque obteniendo valores de LOQs (10 ng/L) superiores a los del presente estudio.

Adicionalmente, una extracción mecánica por SBSE seguida por un análisis mediante GC acoplado a un detector de ionización de llama (FID)⁽²⁴⁾ se aplicó para la determinación de solo 5 PAHs, obteniéndose LODs considerablemente más altos que los de nuestro estudio (20-1100 ng/L). Sin embargo, este trabajo utilizó GC-FID, y por tanto, no se consiguió una identificación inequívoca completa, como sucede en el caso de MS/MS. Más recientemente, *Benedé y col.* ⁽²⁶⁾ aplicaron una novedosa estrategia de SBDLME obteniendo LODs más bajos para los PAHs analizados, excepto en el caso de BaA (8 ng/L).

No obstante, es importante mencionar que todos estos procedimientos miniaturizados terminan siendo metodologías menos adecuadas para el análisis en rutina que el método de SPE que ha sido empleado en el actual trabajo, y que ha sido acreditado bajo la norma internacional ISO/IEC 17025:2017. Y a pesar del hecho de que todos estos métodos recientes sean capaces de proporcionar LODs más bajos, los límites obtenidos en este método son lo suficientemente bajos como para llevar a cabo análisis de muestras reales de acuerdo con la legislación existente en agua. Adicionalmente, el uso de la SPE requiere de un personal menos preparado técnicamente, y todavía se considera un método útil para extraer contaminantes medioambientales debido a la

disponibilidad de un amplio rango de sorbentes con diversas características de sorción.

3.3.3. Análisis de muestras reales

El método validado ha sido aplicado a la determinación de PAHs en muestras reales de agua en análisis de rutina. A fin de garantizar que el proceso de medida se encontraba bajo control estadístico, en cada secuencia de muestras se aplicaron actividades de control de calidad interno, procesando dichas muestras junto con: (i) blanco de reactivo y de matriz (útil para eliminar falsos positivos y para identificar posibles interferencias de la matriz); (ii) una muestra de blanco fortificada a la concentración del segundo punto del calibrado a fin de controlar la eficiencia de extracción, de modo que si la mayoría de las recuperaciones oscilaban en el rango de 80-120%, valores entre 70 y 130% podían ser excepcionalmente aceptados; (iii) curvas de calibración preparadas diariamente para comprobar la linealidad ($R^2 > 0,98$), teniendo en cuenta que la desviación de la recta en el primer y segundo punto de calibrado debía ser inferior al $\pm 20\%$; y (iv) se verificó la resolución cromatográfica en base al par BkFA-BjFA, tal como se describió en la **Sección 3.3.1**.

Las muestras enumeradas en la **Sección 3.2.6** fueron sometidas a análisis. No se encontró ningún positivo por encima de los LOQs establecidos. Sin embargo, se detectaron trazas de ANT en dos aguas residuales; esto coincide con lo detectado en publicaciones previas⁽¹⁸⁾. Con respecto al control de calidad externo, se llevó a cabo la participación en un estudio interlaboratorio a fin de evaluar el funcionamiento del método para PAHs de acuerdo con los requerimientos del organismo de acreditación. Se analizó una muestra ciega de un agua medioambiental, detectándose BaP (61 ng/L), BbFA

(36 ng/L), BkFA (39 ng/L), BghiP (3 ng/L) e IP (3 ng/L) (**Tabla S4**). En todos los casos, los valores de *Z-score* se encontraban dentro del intervalo satisfactorio (-2, +2). La **Figura S1** muestra el cromatograma obtenido para la muestra analizada. En consecuencia, el método desarrollado demostró ser lo suficientemente sensible, y por tanto, totalmente adecuado, para la determinación fiable en análisis de rutina de niveles traza de estos contaminantes en muestras acuosas.

3.4. CONCLUSIONES

Se ha validado un método analítico sensible que permite la determinación de 12 PAHs mediante GC-QqQ-MS/MS en cuatro tipos de agua (de consumo, residual, de mar y continental no tratada) a bajos niveles (ng/L), mostrando un funcionamiento adecuado. Adicionalmente, los LODs y LOQs obtenidos son lo suficientemente bajos de acuerdo con los requisitos de la legislación de la UE. Con respecto al análisis cromatográfico, se aplicó con éxito una columna específica desarrollada para la determinación de PAHs para evitar la completa co-elución de algunos grupos de isómeros, tales como benzo[*b*], [*j*] y [*k*] fluorantenos. Todas estas características mencionadas, hacen este método idóneo para su aplicación en laboratorios químicos para el análisis en rutina de muestras de agua, estando acreditado además bajo la ISO/IEC 17025:2017, lo que respalda la calidad de los resultados obtenidos. En este contexto, se obtuvieron resultados excelentes en el estudio interlaboratorio en el que se participó, demostrando su capacidad de generar medidas fiables de los PAHs. Adicionalmente, es importante destacar que nuestra metodología validada completamente amplía otros métodos recogidos en literatura, principalmente debido al hecho de que la mayoría de ellos están validados pero no acreditados por ninguna norma de calidad

internacional. No obstante, teniendo en mente los límites restrictivos publicados en la legislación más reciente (Directiva 2013/39/UE), como objetivo futuro, quedaría continuar invirtiendo esfuerzos en conseguir un LOD inferior en el caso específico de BghiP en otras aguas superficiales.

3.5. REFERENCIAS

¹ Bizkarguenaga E., Ros O., Iparraguirre A., Navarro P., Vallejo A., Usobiaga A., Zuloaga O., *Solid-phase extraction combined with large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry for the multiresidue determination of priority and emerging organic pollutants in wastewater*, J. Chromatogr. A, 1247(2012) 104-117.

² Kouzayha A., Iskandarani M. A., Mokh S., Rabaa A. R., Budzinski H., Jaber F., *Optimization of a solid-phase extraction method using centrifugation for the determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in water*, J. Agric. Food Chem., 59 (2011) 7592-7600.

³ Robles-Molina J., Gilbert-López B., García-Reyes J. F., Molina-Díaz A., *Monitoring of selected priority and emerging contaminants in the Guadalquivir River and other related surface waters in the province of Jaén, South East Spain*, Sci. Total Environ., 479-480 (2014) 247-257.

⁴ *Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy*, Off. J. Eur. Union, L226 (2013) 1-17.

⁵ Wenzl T., Simon R., Kleiner J., Anklam E., *Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union*, Trends Anal. Chem., 25 (2006) 716-725.

⁶ Plaza-Bolaños P., Frenich A. G., Vidal J. L. M., *Review: Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends*, J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 6303-6326.

⁷ Khalili-Fard V., Ghanemi K., Nikpour Y., Fallah-Mehrjardi M., *Application of sulfur microparticles for solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from sea water and wastewater samples*, Anal. Chim. Acta, 714 (2012) 89-97.

⁸ Charalabaki M., Psillakis E., Mantzavinos D., Kalogerakis N., *Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater treatment plant effluents using hollow fiber liquid-phase microextraction*, Chemosphere, 60 (2005) 690-698.

⁹ <http://www.who.int/foodsafety/chem/en/> (last accessed on May 2018).

¹⁰ <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>, (last accessed on May 2018).

¹¹ <http://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf> (last accessed on May 2018).

¹² <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulation-table> (last accessed on May 2018).

¹³ Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, Off. J. Eur. Union, L348 (2008) 84-97.

¹⁴ Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption, Off. J. Eur. Comm., L330 (1998) 32-54. Consolidated version available on <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1998L0083:20090807:EN:PDF> (last accessed May 2018).

¹⁵ Marcé R. M., Borrull F., *Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds*, J. Chromatogr. A, 885 (2000) 273-90.

¹⁶ Ma J., Xiao R., Li J., Yu J., Zhang Y., Chen L., *Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples by solid-phase extraction using multi-walled carbon nanotubes as adsorbent coupled with gas chromatography-mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 5462-5469.

¹⁷ García-Falcón M. S., Pérez-Lamela M., Simal-Gándara J., *Comparison of strategies for extraction of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons from drinking waters*, J. Agric. Food Chem., 52 (2004) 6897-6903.

¹⁸ Domínguez I., Arrebola F. J., Gavara R., Martínez-Vidal J. L., Garrido-Frenich A., *Automated and simultaneous determination of priority substances and polychlorinated biphenyls in wastewater using headspace solid phase microextraction and high resolution mass spectrometry.*, Anal. Chim. Acta, 1002 (2018) 39-49.

¹⁹ Xiang-Feng C., Hao Z., Xia W., Jian-Guang C., Ru-Song Z., Chuan-Ge C., Xiao-Qing L., *Metal-organic framework MIL-53(Al) as solid-phase microextraction adsorbent for the determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by gas chromatography-tandem mass spectrometry*, Analyst, 137 (2012) 5411-5419.

²⁰ Domínguez I., Arrebola F. J., Romero-González R., Nieto-García A., Martínez-Vidal J. L., Garrido-Frenich A., *Solid phase microextraction and gas chromatography coupled to magnetic sector high resolution mass spectrometry for the ultra-trace determination of contaminants in surface water*, J. Chromatogr. A, 1518 (2017) 15-24.

²¹ Bianchin J. N., Nardini G., Merib J., Dias A. N., Martendal E., Carasek E., *Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in water samples using a new sampling strategy combining different extraction modes and temperatures in a single extraction solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry procedure*, J. Chromatogr. A, 1233 (2012) 22-29.

²² López-López J. A., Ogalla-Chozas E., Lara-Martín P. A., Pintado-Herrera M. G., *Solvent bar micro-extraction (SBME) based determination of PAHs in seawater samples*, Sci. Total Environ., 598 (2017) 58-63.

²³ Fernández M., Clavijo S., Forteza R., Cerdá V., *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons using lab on valve dispersive liquid-liquid microextraction coupled to high performance chromatography*, Talanta, 138 (2015) 190-195.

²⁴ Mollahosseini A., Rokue M., Mojtahedi M. M., Toghroli M., Toghroli M., Kamankesh M., Motaharian A., *Mechanical stir bar sorptive extraction followed by*

gas chromatography as a new method for determining polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples, *Microchem. J.*, 126 (2016) 431-437.

²⁵ Barco-Bonilla N., Romero-González R., Plaza-Bolaños P., Fernández-Moreno J. L., Garrido-Frenich A., Martínez-Vidal J. L. *Comprehensive analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater using stir bar sorptive extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry*, *Anal. Chim. Acta*, 693 (2011) 62-71.

²⁶ Benedé J. L., Anderson J. L., Chisvert A., *Trace determination of volatile polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters by magnetic ionic liquid-based stir bar dispersive liquid microextraction*, *Talanta*, 176 (2018) 253-261.

²⁷ Fu S., Fan J., Hashi Y., Chen Z., *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples using online microextraction by packed sorbent coupled with gas chromatography-mass spectrometry*, *Talanta*, 94 (2012) 152-157.

²⁹ UNE-EN-ISO/IEC/17025:2017, 2017. *General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories*.

³⁰ Commission Decision No. 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Off. J. Eur. Comm.*, L 221 (2002) 8-36.

³¹ SANTE/11813/2017, *Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed (01/01/2018)*.

³² Garrido-Frenich A., Martínez-Vidal J. L., López T. L., Aguado S. C., Salvador I. J. M., *Monitoring multi-class pesticide residues in fresh fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, 1048 (2004) 199-206.

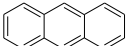
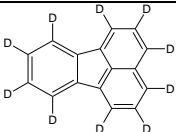
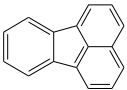
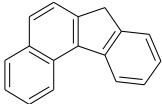
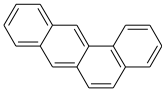
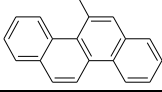
³³ Rodríguez L.C., Torres M. E. H., López E. A., González F. J. E., Arrebola F. J., Martínez-Vidal J. L. *Assessment of uncertainty in pesticide multiresidue analytical methods: main sources and estimation*, *Anal. Chim. Acta*, 454 (2002) 297-314.

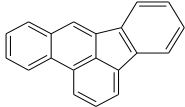
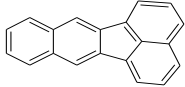
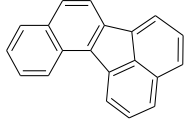
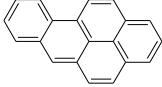
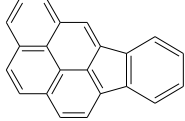
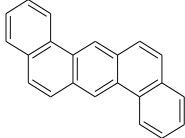
³⁴ www.eurachem.org (last accessed May 2018)

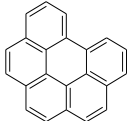
³⁵ Tillner J., Hollard C., Bach C., Rosin C., Munoz J. F., Dauchy X., *Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and their chlorination by-products in drinking water and the coatings of water pipes by automated solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry*. *J. Chromatogr. A*, 1315 (2013) 36-46.

*Material suplementario del análisis de PAHs en
agua*

Tabla S1. Estructuras moleculares, abreviaturas comunes y condiciones GC-MS/MS para los PAHs analizados y el estándar interno utilizado.

PAHs	Estructura molecular	Acrónimos	Ion precursor (m/z)	Iones producto, m/z (energía colisión, eV)	Dwell time (s)
Antraceno ^{a,b}		ANT	178	152 (15) 176 (25) 177 (10)	0,100
Fluoranteno-d ₁₀ (IS)		FA-d ₁₀	212	208 (35) 156 (50)	0,050
Fluoranteno ^{a,b}		FA	202	174 (50) 200 (35) 201 (10)	0,050
Benzo[<i>c</i>]fluoreno		BcL	216	189 (30) 213 (30) 215 (10)	0,050
Benzo[<i>a</i>]antraceno ^a		BaA	228	200 (50) 224 (50) 226 (25)	0,070
5-Metilcriseno		MCH	242	226 (35) 239 (35) 241 (10)	0,070

PAHs	Estructura molecular	Acrónimos	Ion precursor (m/z)	Iones producto, m/z (energía colisión, eV)	Dwell time (s)
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno ^{a,b}		BbFA	252	224 (50) 249 (45) 250 (35)	0,080
Benzo[<i>k</i>]fluoranteno ^{a,b}		BkFA	252	224 (50) 249 (45) 250 (35)	0,080
Benzo[<i>j</i>]fluoranteno		BjFA	252	250 (35) 249 (45) 224 (50)	0,080
Benzo[<i>a</i>]pireno ^{a,b}		BaP	252	251 (25) 249 (50) 224 (50)	0,080
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno ^{a,b}		IP	276	275 (15) 274 (40) 273 (50)	0,100
Dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno ^a		DBaH	278	250 (40) 274 (50) 276 (30)	0,100

PAHs	Estructura molecular	Acrónimos	Ion precursor (m/z)	Iones producto, m/z (energía colisión, eV)	Dwell time (s)
Benzo[ghi]perileno ^{a,b}		BghiP	276	275 (20) 274 (50) 273 (45)	0,150

^b PAHs clasificados como sustancias prioritarios en el campo de la política de aguas por la UE de acuerdo con la Directiva Marco del Agua de la UE (14); Abreviaturas: IS: estándar interno.

Tabla S2. Información sobre los parámetros de validación.

Parámetro	Información
Identificación, selectividad y especificidad	<p>La identificación de los compuestos estudiados se basó en las RTWs y en la relación de los iones objetivo. Con respecto a la RTW, se define como el promedio del tiempo de retención \pm tres veces la desviación estándar del tiempo de retención ($RT \pm 3SD$) obtenido analizando 5 muestras blanco fortificadas a 25 ng/L. RT se calculó como el RT relativo considerando el IS ($RT = Rt_a/Rt_{IS}$). Adicionalmente, se estimó la relación de iones entre las diferentes transiciones de cada analito. La relación de iones fue calculada, por tanto, como el valor promedio expresado como porcentaje de las intensidades del ion menos intenso (confirmación) frente al más intenso (cuantificación), analizando 5 muestras de blanco fortificadas a 25 ng/L.</p> <p>Se analizaron muestras blanco de la matriz y blancos de reactivo para evaluar la selectividad/especificidad del método. La ausencia de cualquier señal a la RTW donde los analitos eluyen, al monitorizar las transiciones mostradas en la Tabla S1, indicaron la inexistencia de interferentes de la matriz que pudieran conducir a una señal de un falso positivo.</p> <p>Con respecto a la confirmación de los PAHs identificados como positivos en muestras reales de agua, ésta se llevó a cabo considerando la relación entre los iones de confirmación y cuantificación. En este sentido, se estableció una tolerancia máxima relativa del $\pm 30\%$ para todos los valores de relación de iones ($<1,00$).</p>
Efecto matriz y linealidad	<p>El área de pico (área del analito/área del IS) se usó como respuesta para todos los compuestos, excepto para el BkFA y BjFA, isómeros para los cuales se empleó la altura de pico (altura del analito/altura del IS).</p> <p>La linealidad del método se evaluó realizando rectas de calibrado de agua Milli-Q a tres niveles de concentración (5, 25 y 100 ng/L); particularmente, las rectas de calibrado se modificaron para IP y BghiP en agua de mar y aguas continentales no tratadas (1,4, 5, 25 y 100 ng/L) debido a los requerimientos de la legislación (4). Con respecto a la linealidad, los</p>

Parámetro	Información
	coeficientes de correlación (R^2) tienen que ser $\geq 0,98$, y cada punto individual de la recta de calibrado no debe desviarse más del $\pm 20\%$ del resto.
Veracidad y precisión	La veracidad se evaluó a través de estudios de recuperación que se llevaron a cabo fortificando muestras de agua ($n = 5$) a dos niveles de concentración (5,6 y 25 ng/L) para agua de consumo y agua residual, y a tres niveles (1,7, 5,6 y 25 ng/L) para agua de mar y continental no tratada. La precisión total del método se calculó mediante estudios de precisión intra-día e inter-día. Ambas precisiones intra- e inter-día ($n=5$) se estudiaron fortificando a los mismos niveles de concentración evaluados en el estudio de veracidad, analizando cinco réplicas a cada nivel. Los valores de recuperación deben encontrarse en el rango de 70-120% y los valores de RSD ser $\leq 20\%$.
Límites de detección y límites de cuantificación	Los LODs y LOQs se estimaron como la mínima concentración a la que los compuestos de interés podían ser identificados y cuantificados, respectivamente, con absoluta fiabilidad. Así, los LODs y LOQs se definieron como la concentración de analito más baja para la cual la relación señal-ruido (S/N) era 3 y 10, respectivamente. Siempre que la RSD fuera $\leq 20\%$ y la $S/N > 10$, se estableció como LOQ el primer nivel de concentración de la recta de calibrado, a fin de facilitar la cuantificación y los controles de calidad.
Incertidumbre	Los valores de incertidumbre se estimaron utilizando una estrategia de “abajo-arriba” (<i>bottom-up</i>) usando datos de validación interna. Estos valores para los diferentes analitos en las distintas matrices debían ser $\leq 46\%$ en el caso de niveles de concentración inferiores al segundo punto de calibrado para IP y BghiP en aguas continentales no tratadas y de mar (5 ng/L), $\leq 35\%$ para concentraciones inferiores al segundo nivel de concentración de la recta de calibrado para el resto de PAHs (25 ng/L) y $\leq 25\%$ en el caso de concentraciones superiores o idénticas a 25 ng/L. Estos umbrales aparecen descritos en la guía <i>Eurachem/CITAC</i> .

Tabla S3. Rango de valores de carbono orgánico total (TOC) y conductividad eléctrica (EC) para las muestras analizadas.

Tipo de agua	Lugar de muestreo	TOC (mg/L)	EC (μS/cm)
Consumo	Diferentes ciudades	<1,0 - 2,1	315,0-925,4
Continental	Ríos, canales de riego	1,2 - 13,5	254,0 - 1239,6
Mar	Costa de Almería	3,7 - 21,2	3,51 g/L*
Residual	Efluentes de plantas de tratamiento	1,3 - 553,7	610-1480

*: Salinidad

Tabla S4. Valores de relación de iones y tolerancia obtenidos para los diferentes tipos de aguas analizados.

Analito	Agua consumo		Agua residual		Agua mar		Agua continental no tratada	
	Relación iones relativa (%)	Tolerancia (%)	Relación iones relativa (%)	Tolerancia (%)	Relación iones relativa (%)	Tolerancia (%)	Relación iones relativa (%)	Tolerancia (%)
ANT ^a	59	30	52	30	67	20	71	30
FA	83	30	84	30	80	28	82	30
BcL	32	30	35	30	33	25	39	30
BaA	37	30	38	30	36	25	38	30
MCH	79	30	83	30	75	20	87	30
BbFA	47	30	48	30	45	25	46	30
BkFA	48	30	50	30	46	25	44	30
BjFA	48	30	50	30	47	25	47	30
BaP	56	30	54	30	52	20	52	30
IP	89	30	84	30	90	20	96	30
DBahA	45	30	46	30	46	25	48	30
BghiP	79	30	72	30	71	20	69	30

^a Abreviaturas: véase **Tabla S1**

Tabla S5. Resultados obtenidos (ng/L) de la aplicación de este método a las pruebas de competencia entre laboratorios (estudio interlaboratorio).

<i>Analito</i>	<i>Valor obtenido (ng/L) en nuestro laboratorio</i>	<i>Valor asignado (ng/L)</i>	<i>Z-score^a</i>	<i>Nº laboratorios participantes</i>	<i>Nº laboratorios con un Z-score satisfactorio</i>
BaP	61,0	60,0	0,067	7	7
BbFA	36,0	38,1	-0,22	7	7
BkFA	39,0	44,1	-0,464	7	7
BghiP	3,0	3,0	0	6	4
IP	3,0	3,3	-0,361	6	4

^aZ-score = (Valor obtenido - Valor asignado)/S; donde S = unidad de desviación
 Abreviaturas: véase Tabla S1.

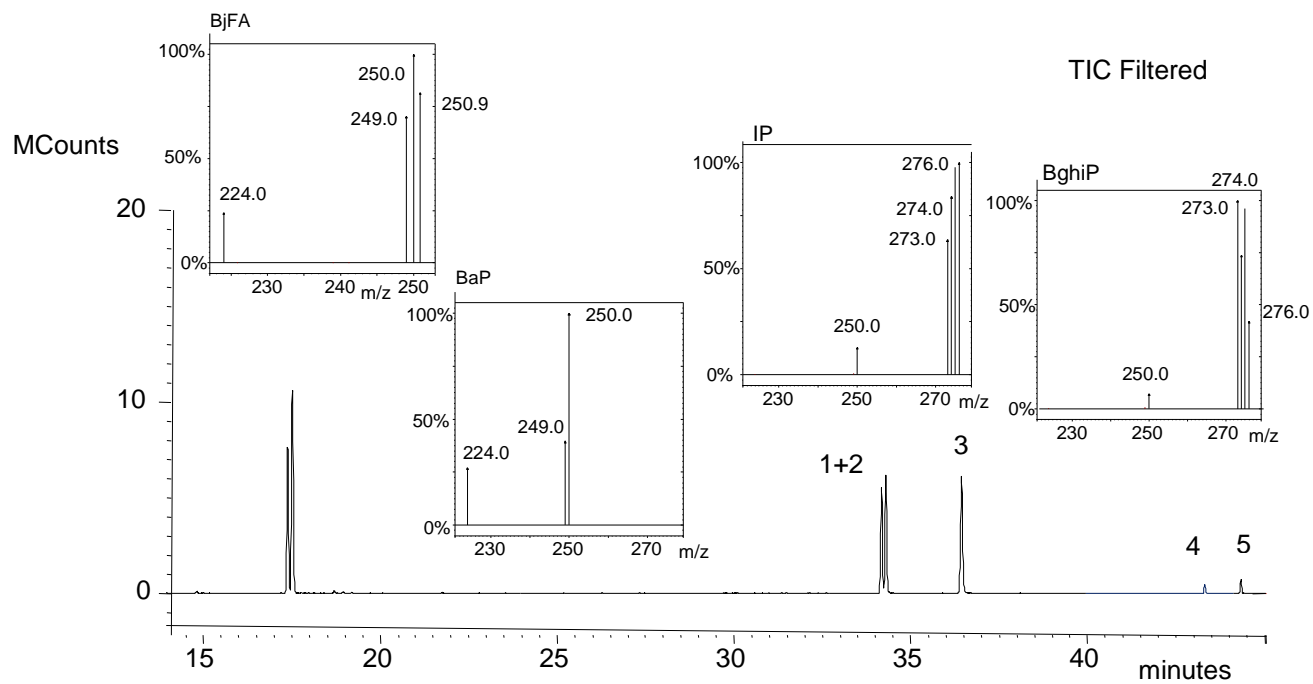
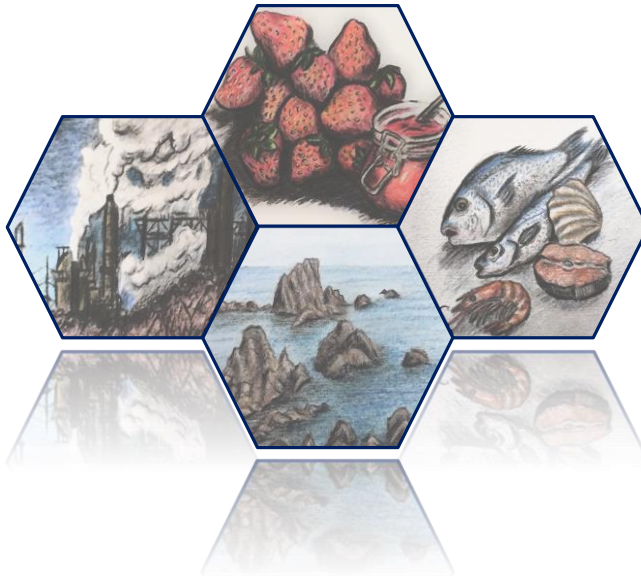


Figura S1. Cromatograma total de iones (TIC) obtenido en la muestra analizada del estudio interlaboratorio. Se detectaron BbFA (1), BkFA (2), BaP (3), IP (4) and BghiP (5).

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO



1. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones derivadas de los trabajos experimentales incluidos en esta Tesis son:

- I. La aplicación de la técnica instrumental de UHPLC-QqQ-MS/MS permite la optimización de métodos analíticos con tiempos de análisis cortos, además de ofrecer una adecuada sensibilidad y resolución cromatográfica para analizar contaminantes en alimentos a bajos niveles de concentración y conforme a la legislación vigente.
- II. La complejidad de la matriz de productos piscícolas y la baja sensibilidad mostrada por los metabolitos de nitrofuranos ha requerido una derivatización de los mismos para conseguir una adecuada separación cromatográfica y sensibilidad del método. En las muestras reales de diferentes crustáceos analizadas no se detectaron residuos de nitrofuranos por encima del MRPL = 1 µg/L establecido por la UE, por lo que se confirmó el cumplimiento de “tolerancia cero” frente a estos compuestos.
- III. Se ha desarrollado un método multiresiduo sensible y con un corto tiempo de análisis aplicable al análisis de 250 plaguicidas en matrices de frutas procesadas en laboratorios de rutina. Entre ellos, se han incluido y validado algunos que habitualmente son aplicados en el cultivo ecológico, como el caso de los insecticidas espinosad y azadiractina. El procedimiento ha sido acreditado mediante la Norma ISO 17025 en la empresa LAB.
El método se ha aplicado al análisis de residuos en muestras reales de frutas procesadas (purés, purés concentrados,

pulpa, mermelada y fruta en almíbar), detectando varios compuestos tanto a nivel de trazas como a niveles superiores al LOQ. Esto pone de manifiesto la necesidad de monitorizar la presencia de residuos de plaguicidas en frutas procesadas, matriz en la que la legislación no ha establecido todavía LMRs.

- IV. Se ha mejorado el método de análisis de PAHs mediante uso de GC-MS/MS en distintos tipos de agua (de consumo, residual, de agua de mar y continental no tratada) usando una columna capilar específica que ha permitido evitar la coelución de algunos grupos de isómeros, como benzo[*b*], [*j*] y [*k*] fluorantenos, mejorando la resolución cromatográfica.

El método, que aplica una extracción mediante SPE, es apto para el análisis por laboratorios de rutina de PAHs en distintos tipos de agua (de mar, de consumo, residual y continental no tratada).

2. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Se continuarán los procesos de mejora en metodologías analíticas, soportadas en el uso de instrumentación de cromatografía-espectrometría de masas de baja y de alta resolución aplicados a la resolución de problemas analíticos en el campo de la seguridad alimentaria y del control ambiental, tales como residuos de plaguicidas y fármacos, contaminantes e incluso tóxicos en plantas. La relevancia de nuevas familias de sustancias que requieren estudios por su potencial riesgo para la salud y medioambiente y de nuevos alimentos, el control de metabolitos y/o productos de transformación, así como otros temas ligados a la autenticación o fraude de alimentos, dibuja un futuro lleno de retos científico.

Otras aportaciones científicas

PUBLICACIONES

- ✎ **Noelia M. Valera-Tarifa**, Patricia Plaza-Bolaños, Roberto Romero-González, José L. Martínez-Vidal, Antonia Garrido-Frenich, **Determination of nitrofuran metabolites in seafood by ultra high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry**, *Journal of Food Composition and Analysis* 30 (2013) 86-93.
- ✎ Patricia Plaza-Bolaños, **Noelia M. Valera-Tarifa**, Antonia Garrido Frenich, **Current applications of GC-(Q)TOF and GC-HRMS for the determination of persistent organic pollutants in water and sediments samples**, pp. 431-454, Chapter 18, *Comprehensive Analytical Chemistry, Volume 61: Advanced techniques in gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS-MS and GC-TOF-MS) for environmental chemistry*, Elsevier (2013).
- ✎ Nieves Barco-Bonilla, Patricia Plaza-Bolaños, **Noelia M^a Valera Tarifa**, Roberto Romero-González, José Luis Martínez Vidal, Antonia Garrido Frenich, **Highly sensitive determination of polybrominated diphenyl ethers in surface waters by GC coupled to high-resolution MS according to the EU Water Directive 2008/105/EC**, *Journal of Separation Science* 37 (2014) 69-76.
- ✎ **Noelia María Valera-Tarifa**, Juan Carlos López-Martínez, José Luis Martínez Vidal, Antonia Garrido Frenich, **Development and validation of a GC-MS/MS method for priority polycyclic aromatic hydrocarbons quantification in different types of water samples**, *Separation Science Plus* 1 (2018) 539-548.

CONGRESOS

- ✓ **Noelia M. Valera Tarifa**, Patricia Plaza Bolaños, Roberto Romero González, Noelia López-Gutiérrez, Antonia Garrido Frenich, *Método de extracción miniaturizado para la determinación de nitrofuranos en productos del mar de acuerdo con la Decisión de la Comisión 2003/181/CE*. Congreso XII Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica (GRASEQA 2012), Málaga, 2012.
- ✓ **Noelia M^a Valera-Tarifa**, José Luis Fernández-Moreno, Patricia Plaza-Bolaños, José Luis Martínez Vidal, Antonia Garrido-Frenich, *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in different types of water by highly sensitive gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry according to the Water Framework Directive*. XVIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica (SEQA), Úbeda, 2013.
- ✓ Antonia Garrido-Frenich, **Noelia M^o Valera-Tarifa**, Patricia Plaza-Bolaños, José Luis Martínez Vidal, *Simultaneous analysis of pentachlorophenol alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in drinking and surface waters by gas chromatography coupled to mass spectrometry*, VI Reunión de la Sociedad Española de Espectrometría de Masas (SEEM), Úbeda, 2013.
- ✓ **N. M. Valera Tarifa**, E. Hernández Torres, R. Santiago Valverde, J. L. Martínez Vidal, A. Garrido Frenich, *Determinación de residuos de plaguicidas en confecciones de frutas mediante UHPLC-MS/MS*. XIV Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica (GRASEQA 2018) Granada, 2018.