

# Trabajo Fin de Máster

## Facultad de Ciencias Experimentales

Máster en Laboratorio Avanzado de Química



**Determinación de fungicidas triazólicos en frutas y hortalizas mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas**

**Determination of triazole fungicides in fruits and vegetables by liquid chromatography coupled to mass spectrometry**

Alejandro Sánchez Quesada

*Curso académico 2018-2019*

*Convocatoria: Septiembre 2019*

*Fecha: 09/09/2019*





**MEMORIA**



## ÍNDICE

1. RESUMEN .....	3
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN .....	5
3.1. FUNGICIDAS TRIAZÓLICOS .....	5
3.2. COMPUESTOS OBJETO DE ESTUDIO.....	9
3.3. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE FUNGICIDAS TRIAZÓLICOS EN MATRICES VEGETALES .....	15
3.3.1. Métodos de extracción .....	16
3.3.2. Análisis mediante técnicas cromatográficas .....	19
3.3.3. Espectrometría de masas.....	23
3.4. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	24
4. OBJETIVOS .....	27
5. MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	27
5. 1. REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPOS UTILIZADOS.....	27
5.1.1. Reactivos.....	27
5.1.2. Materiales y equipos .....	27
5.2. PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES PATRÓN.....	28
5.3. PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS .....	28
5.4. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN.....	28
5.4.1. Método aplicado .....	28
5.4.2. Otros métodos evaluados .....	28
5.5.CONDICIONES ESPECTROMÉTRICAS .....	29
5.6. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.....	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
6.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS .....	31
6.1.1. Optimización de las condiciones espectrométricas .....	31
6.1.2. Optimización de las condiciones cromatográficas.....	34
6.1.3. Optimización del proceso de extracción.....	36
6.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	38
6.2.1. Linealidad .....	39
6.2.2. Efecto matriz.....	39
6.2.3. Veracidad .....	40
6.2.4. Precisión.....	42

6.2.5. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).....	43
6.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES .....	44
7. CONCLUSIONES.....	46
8. BIBLIOGRAFÍA .....	46
9. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....	51
ANEXOS.....	53
ANEXO 1: REPRESENTACIONES GRÁFICAS DE LA LINEALIDAD DE CADA UNO DE LOS FUNGICIDAS .....	54

## 1. RESUMEN

A raíz del uso de fungicidas triazólicos en la producción de una gran variedad de frutas y hortalizas y de sus efectos perjudiciales sobre la salud humana, se ha desarrollado un método analítico para el control de ciproconazol, difenoconazol, fenbuconazol, miclobutanil, penconazol, propiconazol, tebuconazol y triadimenol, así como del metabolito común 1,2 4-triazol, en uva, fresa, tomate, calabacín y pimiento. Para ello se ha utilizado el método de extracción QuEChERS (*Quick, Easy, Cheaper, Effective, Rugged, Safe*) original y la técnica de cromatografía de líquidos (LC) acoplada a espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Se han obtenido buenas recuperaciones, comprendidas entre 70,1 y 120,0 % y valores de precisión (intra e inter- día)  $\leq 20,0$  % en las cinco matrices para los fungicidas padre. Además, se obtuvieron valores adecuados de límites de detección (1 – 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) y de cuantificación (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Estos resultados avalan el uso de este método para la determinación de fungicidas triazólicos.

**Palabras clave:** *Fungicidas triazólicos, metabolito, QuEChERS, LC-MS/MS, alimentos.*

## 2. ABSTRACT

As a result of the use of triazole fungicides in various foods such as fruits and vegetables and their harmful effects on human health, an analytical method has been developed for the determination of cyproconazole, difenoconazole, fenbuconazole, myclobutanil, penconazole, propiconazole, tebuconazole and triadimenol, as well as its main metabolite, 1,2 4-triazole, in fruits and vegetables such as grape, strawberry, tomato, zucchini and pepper. To carry out this objective, the original extraction QuEChERS method (*Quick, Easy, Cheaper, Effective, Rugged, Safe*) and the analytical technique liquid chromatography (LC) coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS) have been used. Good recoveries from 70.1-120.0 %, as well as suitable precision (intra and inter-day)  $\leq 20.0$  % were obtained in the five matrices for the parent fungicides. In addition, suitable values of limits detection (1 – 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and quantification (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) were achieved. These results support the use of this method for the analysis of parent triazole fungicides.

**Keywords:** *Triazole fungicides, metabolite, QuEChERS, LC-MS/MS, foods.*





### 3. INTRODUCCION

#### 3.1. FUNGICIDAS TRIAZÓLICOS

Según el artículo 2º del *Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas*<sup>1</sup> (FAO, 1990), un plaguicida es “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra su deterioro durante el almacenamiento y transporte”.

Los plaguicidas<sup>2</sup> se utilizan para proteger los cultivos de los insectos, malas hierbas, hongos y de otras plagas. Son muy importantes para producir alimentos ya que mantienen o aumentan el rendimiento, algo muy importante para los países que sufren escasez de alimentos. La División de Población de Naciones Unidas<sup>3</sup> ha calculado que a partir de 2050 la población mundial aumentará a 9700 millones de personas, un 30 % más de las que hay actualmente. La mayor parte de este incremento se producirá en los países en vías de desarrollo. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura<sup>4</sup> (FAO, *Food and Agriculture Organization*), el 80 % del aumento de la producción de los alimentos, necesario para hacer frente al crecimiento demográfico en los países en vías de desarrollo, se obtendrá gracias al mayor rendimiento de los cultivos y al aumento de las cosechas anuales en el mismo suelo. Sólo el 20 % de la producción de alimentos provendrá de la expansión de tierras de cultivo.

Sin embargo, los plaguicidas siguen generando preocupación por sus efectos sobre las personas y el medio ambiente. Algunos plaguicidas antiguos, como los organoclorados, pueden permanecer en el suelo y en el agua durante años. Por ello su uso está prohibido en los países desarrollados, pero aún están en uso en los países en vías de desarrollo. Estos productos presentan un alto riesgo para las personas que los usan en su trabajo, domicilio o jardín. Para proteger a los consumidores de los efectos perjudiciales de los plaguicidas, la Organización Mundial de la Salud (WHO, *World Health Organization*)<sup>5</sup> junto con la FAO y la Unión Europea (EU, *European Union*) estudian los datos científicos disponibles y establecen límites máximos de residuos (MRLs, *Maximum Residue Limits*)<sup>6</sup> para plaguicidas en un gran número de alimentos que son aceptados a nivel internacional.

Los plaguicidas se clasifican<sup>7</sup> según diversos criterios, algunos de los cuales se indican a continuación.

- Según su grado de toxicidad:

- De baja peligrosidad: no presentan riesgos apreciables al ser ingeridos, inhalados o al penetrar cutáneamente.
- Nocivos: presentan riesgos de gravedad limitada al ser ingeridos, inhalados o al penetrar cutáneamente.
- Tóxicos: presentan riesgos graves, agudos o crónicos al ser ingeridos, inhalados o al penetrar cutáneamente. Estos riesgos pueden llegar a ser incluso mortales.
- Muy tóxicos: presentan riesgos extremadamente graves, agudos o crónicos al ser ingeridos, inhalados o al penetrar cutáneamente. Estos riesgos pueden llegar a ser incluso mortales.

Esta clasificación se realiza en base a su toxicidad aguda expresada en dosis letal al 50 % (LD50, *Letal Dosis*) por vía oral o dérmica en ratones, o en concentración letal al 50 % (LC50, *Letal Concentration*) por vía respiratoria en ratones.

- Según su modo de acción:
  - Insecticidas: actúan contra insectos.
  - Acaricidas: actúan contra ácaros.
  - Fungicidas: actúan contra hongos y levaduras.
  - Nematicidas: actúan contra nematodos.
  - Herbicidas: actúan contra malas hierbas.
  - Molusquicidas: actúan contra caracolas y babosas.
  - Rodenticidas: actúan contra roedores.
  - Antibióticos de uso agrícola: actúan contra las bacteriosis de los cultivos.

Según la última encuesta de comercialización de productos fitosanitarios en España, realizada en el año 2017 por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, el grupo de sustancias activas de mayor comercialización corresponde a los fungicidas y bactericidas, con una cantidad de 37.999 toneladas, lo que supone el 52,7% del total (Tabla 1).<sup>8</sup>

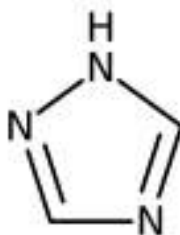
**Tabla 1.** Cantidades comercializadas por los titulares autorizados de los principales grupos de sustancias activas en España (2017).

Sustancias	Cantidad (Toneladas)	% sobre el total
Fungicidas y Bactericidas	37.999	52,7
Herbicidas	16.077	22,3
Insecticidas	6.663	9,2
Molusquicidas	105	0,1
Reguladores del crecimiento	157	0,2
Otros productos fitosanitarios	11.117	15,4
TOTAL	72.118	

Los fungicidas representan un amplio grupo de compuestos que se clasifican en varios tipos,<sup>9</sup> entre ellos:

- Triazólicos y análogos
- Bencimidazoles
- Carboxamidas y Dicarboximidias
- Dimetilditiocarbamatos
- Guanidinas
- Morfolinas
- Fenoxiquinolinas
- Fenilamidas
- Fenil carbamatos
- Fenilpirroles
- Pirimidinas

Entre ellos uno de los grupos más importantes son los triazólicos, todos ellos derivados de la estructura común de 1,2,4-triazol (Figura 1), heterociclo con 2 átomos de carbono y tres de nitrógeno. En la Tabla 2 aparece un resumen de sus características físico-químicas.



**Figura 1.** Estructura del 1,2,4-triazol.

**Tabla 2.** Características físico-químicas del 1,2,4-triazol.

<b>1,2,4-TRIAZOL</b>			
<b>Nombre IUPAC</b>	1H-1,2,4-triazol		
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N <sub>3</sub>	<b>Masa molecular</b>	69,065 g/mol
<b>Punto de ebullición</b>	260° C	<b>Punto de fusión</b>	118-122° C
<b>Punto inflamabilidad</b>	158° C	<b>Presión de vapor (20 °C)</b>	0,2 Pa
<b>Solubilidad en agua</b>	125 mg/l	<b>K<sub>oc</sub></b>	202
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	-0,58	<b>pK<sub>a</sub></b>	2,47
<b>Apariencia</b>	Sólido marrón con olor característico		

Los fungicidas triazólicos presentan una elevada actividad antifúngica y un bajo riesgo a generar resistencia, siendo aplicados en frutas, hortalizas, legumbres, cereales, etc., actuando de forma sistémica.<sup>10</sup> La ventaja de los fungicidas sistémicos es su capacidad para penetrar en las semillas y en las plantas, desplazándose desde su zona de aplicación. Así se redistribuyen en las zonas no tratadas para proteger la planta de ataques de hongos o erradicar los ya presentes. Además de su uso en la agricultura, un gran número de compuestos triazólicos son desarrollados para su uso en medicina como antimicóticos disponibles para tratamientos orales o tópicos<sup>9</sup>. Un ejemplo de estos productos es el fluconazol, el cual es un medicamento que se usa para tratar candidiasis vaginal, candidiasis oral, esofagitis por *Candida* y otras infecciones por *Candida*.<sup>11</sup>

El mecanismo de acción de los compuestos triazólicos reside en su capacidad para interferir en la biosíntesis de los bioesteroles de los hongos y en la inhibición de la biosíntesis de ergosterol. El ergosterol es un componente esencial en la estructura de la membrana celular y en la función de la pared celular en muchos hongos. El bloqueo de la síntesis de ergosterol provoca la muerte celular o la inhibición de su desarrollo. También, se observa un gran número de efectos secundarios como una morfología anormal y la distorsión del hábito de crecimiento normal. Al ser bloqueada la síntesis de los esteroides mayores, se produce la acumulación de un gran número de esteroides intermedios.

Estos fungicidas son las sustancias activas de numerosos productos fitosanitarios,<sup>12</sup> tanto para uso “no profesional” en jardinería (desde 0,0167 %-5 %) como para “uso profesional”, con riquezas que oscilan entre 6 y 30 %, y algunos de los cuales pueden presentar impurezas con cierto riesgo toxicológico como protioconazol-destio (< 0,5 g/kg) en los formulados de protioconazol o 1-metil-pirrolin-2-ona (< 1 g/kg) en los formulados de miclobutanil. Por lo general, los fungicidas triazólicos se aplican mediante pulverización foliar o como tratamiento en polvo en semillas. La toxicidad de los fungicidas triazólicos en mamíferos es generalmente bastante baja. La degradación en el suelo puede ser bastante lenta y se han observado largos períodos de vida media. Sin embargo, estos compuestos no son móviles y se unen al suelo sin adentrarse más allá de la zona de muestreo. Por lo tanto, es poco probable que se filtren y contaminen el agua subterránea<sup>9</sup>.

Los fungicidas triazólicos se transforman en cuatro compuestos principales, conocidos como metabolitos derivados del triazol (TDMs, *triazole derived metabolites*). Dichos metabolitos son 1,2,4-triazol (TRZ, *1,2,4-triazole*), triazol-alanina (TA, *triazole alanine*), triazol-ácido acético (TAA, *triazole acetic acid*) y triazol-ácido láctico (TLA, *lactic acid triazole*), aunque en menor medida también en triazol-ácido pirúvico.<sup>13</sup> El metabolito TRZ puede originarse también por otras fuentes derivadas de la industria farmacéutica, o por el empleo de fertilizantes que contienen inhibidores de la nitrificación como el compuesto 4-amino-1,2,4-triazol.<sup>14</sup>

Sin embargo, otros fungicidas pertenecientes a esta familia, también presentan rutas de degradación específicas, como es el caso de protioconazol que se degrada en protioconazol-destio.<sup>15</sup>

La mayoría de los fungicidas pertenecientes a esta familia presentan carbonos quirales, por lo que los preparados comerciales que se venden son mezclas racémicas que se liberan como una mezcla equimolecular de enantiómero.<sup>16</sup> Para algunos compuestos, tales como triadimenol, se señala que la concentración del diastereoisómero A debe presentar un porcentaje del 70 al 85 %, mientras que los niveles del diastereoisómero B deben oscilar entre el 15 y el 30 %.<sup>17</sup>

Sin embargo, hasta la fecha, los MRLs de estos fungicidas triazólicos, que suelen definirse como suma de isómeros, no incluyen ninguno de estos metabolitos, excepto en el caso de prothioconazol, cuyo principal producto de degradación, prothioconazoldestio, sí está incluido en dicha definición de MRL.<sup>18</sup> En este sentido la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*) señala que se necesitan más estudios sobre la presencia de TDMs, derivados de algunos de estos fungicidas, sobre todo en matrices como manzana y uva.<sup>19</sup>

### 3.2 COMPUESTOS OBJETO DE ESTUDIO

Dentro del grupo de los fungicidas triazólicos, en este Trabajo Fin de Máster se han seleccionado ocho compuestos autorizados por la EU en cultivos, así como el metabolito 1,2,4-triazol (Tabla 3).

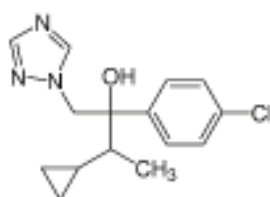
**Tabla 3.** Compuestos triazólicos objeto de estudio

<b>Fungicida progenitor</b>	<b>Metabolito común</b>
Ciproconazol	
Difenoconazol	
Fenbuconazol	
Miclobutanil	
Penconazol	1,2,4-triazol
Propiconazol	
Tebuconazol	
Triadimenol	

El compuesto ciproconazol<sup>9</sup> se utiliza como fungicida sistémico en cereales, remolacha azucarera, árboles frutales, café, plátano, césped y hortalizas. Es rápidamente absorbido por la planta con translocación. En la Tabla 4 se reúnen algunas características físico-químicas de este compuesto.

**Tabla 4.** Características físico-químicas de ciproconazol.

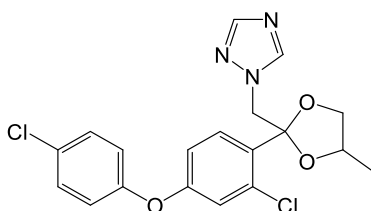
<b>CIPROCONAZOL</b>			
<b>Nombre IUPAC</b>	2- (4-clorofenil) -3-ciclopropil-1- (1H-1,2,4-triazol-1-il) butan-2-ol		
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O	<b>Masa molecular</b>	291,779 g/mol
<b>Punto de ebullición</b>	250°C	<b>Punto de fusión</b>	107,5°C
<b>Punto inflamabilidad</b>	243,6	<b>Presión de vapor (20 °C)</b>	0,026·10 <sup>-3</sup> Pa
<b>Solubilidad en agua</b>	93 mg/l	<b>K<sub>oc</sub></b>	140
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	2,91	<b>Apariencia</b>	Cristal incoloro
<b>Estructura</b>			



Difenoconazol<sup>20</sup> es un fungicida que se utiliza en el control de enfermedades causadas por hongos en frutas, verduras, cereales y otros cultivos. También se usa en el tratamiento de semillas contra una amplia variedad de patógenos en trigo y cebada. En la Tabla 5 se reúnen algunas características físico-químicas de este compuesto.

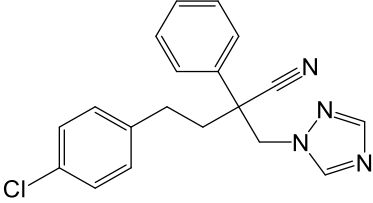
**Tabla 5.** Características físico-químicas de difenoconazol.

<b>DIFENOCONAZOL</b>			
<b>Nombre IUPAC</b>	1 - ((2- (2-Cloro-4- (4-clorofenoxi) fenil) -4-metil-1,3-dioxolan-2-il) metil) -1H-1,2,4-triazol		
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	<b>Masa molecular</b>	406,263 g/mol
<b>Punto de ebullición</b>	100,8 °C	<b>Punto de fusión</b>	76 °C
<b>Punto inflamabilidad</b>	284,6° C	<b>Presión de vapor (20 °C)</b>	3,3·10 <sup>-5</sup> Pa
<b>Solubilidad en agua</b>	15 mg/l	<b>K<sub>oc</sub></b>	1100
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	4,20	<b>Apariencia</b>	Sólido cristalino
<b>Estructura</b>			



Fenbuconazol<sup>9</sup> se usa para el control de hongos en cereales, frutales, frijoles, arroz, frutos secos, remolacha azucarera, ornamentales y hortalizas. También se puede utilizar en tratamientos postcosecha y en semillas. En la Tabla 6 se reúnen algunas características físico-químicas de este compuesto.

**Tabla 6.** Características físico-químicas de fenbuconazol.

FENBUCONAZOL			
<b>Nombre IUPAC</b>	4- (4-clorofenil) -2-fenil-2- (1,2,4-triazol-1-ilmetil) butanonitrilo		
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub>	<b>Masa molecular</b>	336,823 g/mol
<b>Punto de ebullición</b>	546,3° C	<b>Punto de fusión</b>	125,0° C
<b>Punto inflamabilidad</b>	284,2° C	<b>Presión de vapor (20 °C)</b>	5 · 10 <sup>-6</sup> Pa
<b>Solubilidad en agua</b>	0,2 mg/l	<b>K<sub>oc</sub></b>	2100-9000
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	3,23	<b>Apariencia</b>	Cristal incoloro
<b>Estructura</b>			

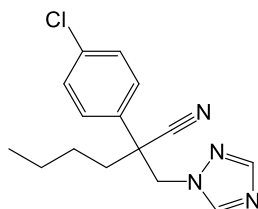
Miclobutanil se usa para el control de hongos en una amplia variedad de cultivos. Así por ejemplo se aplica para sarna y mildiu pulverulento en manzana y pera, moho polvoriento y varias enfermedades en trigo. También se utiliza en el tratamiento de semillas y en cebada, maíz, algodón, arroz y trigo<sup>9</sup>. Aunque tiene una baja toxicidad aguda, miclobutanil<sup>21</sup> puede afectar a las capacidades reproductivas de los animales, causar diversos grados de toxicidad hepática y perturbar la homeóstasis de las hormonas esteroides de los roedores. En la Tabla 7 se reúnen algunas características físico-químicas de este compuesto.

El compuesto penconazol<sup>9</sup> se utiliza para el control de mildiú polvoriento, costra de pepita y otros ascomicetos patógenos, basidiomicetos y deuteromicetos en vid, cucurbitáceas, frutas de pepita, frutas de hueso, ornamentales, lúpulos, tabaco y hortalizas. En la Tabla 8 se reúnen algunas características físico-químicas de este compuesto.

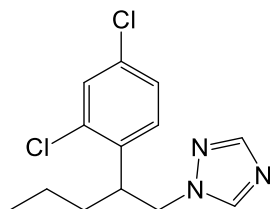


**Tabla 7.** Características físico-químicas de miclobutanil.

<b>MICLOBUTANIL</b>			
<b>Nombre IUPAC</b>	2 - ((1H-1,2,4-triazol-1-il) metil) -2- (4-clorofenil) hexanonitrilo		
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub>	<b>Masa molecular</b>	288,779 g/mol
<b>Punto de ebullición</b>	391°C	<b>Punto de fusión</b>	70°C
<b>Punto inflamabilidad</b>	235,2° C	<b>Presión de vapor (20 °C)</b>	2,13·10 <sup>-4</sup> Pa
<b>Solubilidad en agua</b>	142 mg/l	<b>K<sub>oc</sub></b>	500
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	2,94	<b>Apariencia</b>	Cristal amarillo pálido
<b>Estructura</b>			

**Tabla 8.** Características físico-químicas de penconazol.

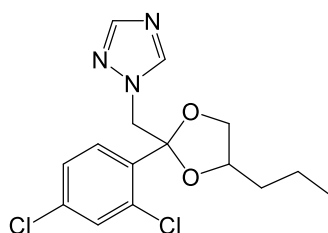
<b>PENCONAZOL</b>			
<b>Nombre IUPAC</b>	1- [2- (2,4-diclorofenil) pentil] -1,2,4-triazol		
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	<b>Masa molecular</b>	284,184 g/mol
<b>Punto de ebullición</b>	415,3° C	<b>Punto de fusión</b>	60° C
<b>Punto inflamabilidad</b>	204,9° C	<b>Presión de vapor (20 °C)</b>	3,7·10 <sup>-4</sup> Pa
<b>Solubilidad en agua</b>	73 mg/l	<b>K<sub>oc</sub></b>	620
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	3,72	<b>Apariencia</b>	Sólido gris
<b>Estructura</b>			



Propiconazol<sup>9</sup> es un fungicida aplicado en frutas, verduras, granos, semillas y maderas duras para la protección contra el moho, el óxido y las manchas foliares. En la Tabla 9 se reúnen algunas características físico-químicas de este compuesto.

**Tabla 9.** Características físico-químicas de propiconazol.

<b>PROPICONAZOL</b>			
<b>Nombre IUPAC</b>	1 - [[2- (2,4-diclorofenil) -4-propil-1,3-dioxolan-2-il] metil] -1,2,4-triazol		
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	<b>Masa molecular</b>	342,22 g/mol
<b>Punto de ebullición</b>	414,93 °C	<b>Punto de fusión</b>	172,86° C
<b>Punto inflamabilidad</b>	244,1° C	<b>Presión de vapor (20 °C)</b>	5,6·10 <sup>-5</sup> Pa
<b>Solubilidad en agua</b>	100 mg/l	<b>K<sub>oc</sub></b>	650-1200
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	3,72	<b>Apariencia</b>	Líquido amarillento
<b>Estructura</b>			

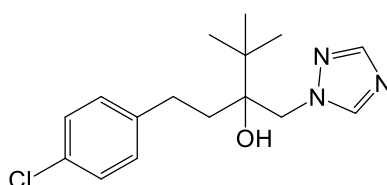


Tebuconazol<sup>22</sup> es un fungicida triazólico de amplio espectro usado para controlar una amplia variedad de enfermedades de las plantas. Por ello es uno de los fungicidas más vendidos en el mundo y es utilizado en una amplia gama de cultivos, incluyendo cereales, verduras, frutos secos y frutas. Sin embargo, este fungicida es perjudicial para los peces y otros organismos acuáticos. Sancho y col.<sup>23</sup> encontraron que la exposición a corto plazo a tebuconazol induce deterioro fisiológico en los peces cebra macho. Además, estudios anteriores también demostraron que tebuconazol puede ser persistente en el ambiente durante mucho tiempo<sup>22</sup>. Este compuesto ha sido citado como un potencial neurotóxico que afecta a funciones endocrinas y provoca alteraciones inmunes. De hecho, la Agencia de Protección Ambiental (EPA, *Environmental Protection Agency*) de Estados Unidos lo ha clasificado como un "posible carcinógeno humano" porque causa importantes efectos tóxicos y reproductivos en ratones de laboratorio. En la Tabla 10 se reúnen algunas características físico-químicas de este compuesto.

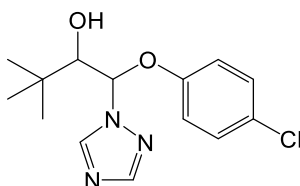
El fungicida triadimenol<sup>9</sup> se utiliza para el control de hongos en cereales, vid, lúpulo, café, tomate, verduras, frutas, tabaco, caña de azúcar y plantas ornamentales, entre otros cultivos. Además se usa como un tratamiento de semillas para controlar el tizón y otras enfermedades de los cereales. En la Tabla 11 se reúnen algunas características físico-químicas de este compuesto.

**Tabla 10.** Características físico-químicas de tebuconazol.

<b>TEBUCONAZOL</b>			
<b>Nombre IUPAC</b>	1- (4-clorofenil) -4,4-dimetil-3- (1,2,4-triazol-1-ilmetil) pentan-3-ol		
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O	<b>Masa molecular</b>	307,822 g/mol
<b>Punto de ebullición</b>	476,9° C	<b>Punto de fusión</b>	102,4°C
<b>Punto inflamabilidad</b>	242,2° C	<b>Presión de vapor (20 °C)</b>	1,7·10 <sup>-6</sup> Pa
<b>Solubilidad en agua</b>	36 mg/l	<b>K<sub>oc</sub></b>	1040
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	3,7	<b>Apariencia</b>	Cristal incoloro
<b>Estructura</b>			

**Tabla 11.** Características físico-químicas de triadimenol.

<b>TRIADIMENOL</b>			
<b>Nombre IUPAC</b>	1- (4-clorofenoxi) -3,3-dimetil-1- (1,2,4-triazol-1-il) butan-2-ol		
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	<b>Masa molecular</b>	295,767 g/mol
<b>Punto de ebullición</b>	465,4° C	<b>Punto de fusión</b>	124,0° C
<b>Punto inflamabilidad</b>	235,3° C	<b>Presión de vapor (20 °C)</b>	6·10 <sup>-7</sup> / 4·10 <sup>-7</sup> Pa (según diastereoisómero)
<b>Solubilidad en agua</b>	62/33 mg/l (según diastereoisómero)	<b>K<sub>oc</sub></b>	230
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	3.08/ 3,28 (según diastereoisómero)	<b>Apariencia</b>	Sólido cristalino incoloro
<b>Estructura</b>			



El Reglamento (CE) n° 396/2005<sup>6</sup> del Parlamento Europeo y del Consejo del 23 de febrero de 2005 y documentos posteriores que incluyen diversas modificaciones recogen los MRLs de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal. En la base de datos<sup>18</sup> de la Comisión Europea se pueden encontrar actualizados los MRLs para todas las combinaciones plaguicida/matriz en los que se encuentran establecidos. Sin embargo en los casos en los que no se ha fijado un MRL se ha establecido un límite general aplicable por defecto de 0,01 mg/kg.

En la Tabla 12 se presentan los MRLs establecidos por la EU para cada uno de los fungicidas objeto de estudio en las matrices que se estudian en el presente trabajo.

**Tabla 12.** Límites Máximos de Residuos establecidos por la EU para los fungicidas objeto de estudio en cada una de las matrices.

Plaguicida	MRL (mg/kg)				
	Uva	Fresa	Tomate	Pimiento	Calabacín
Ciproconazol	0,2	0,05	0,05	0,05	0,05
Difenoconazol	3	0,5	2	0,8	0,3
Fenbuconazol	1	0,05	0,5	0,6	0,2
Miclobutanil	1	1	0,3	0,5	0,2
Propiconazol	0,3	0,01	3	0,01	0,01
Tebuconazol	1	0,02	0,9	0,6	0,6
Triadimenol	0,3	0,5	0,3	0,5	0,15

Para el metabolito común a todos estos fungicidas triazólicos 1,2,4-triazol no se ha fijado MRL. Por tanto, se debería aplicar el límite por defecto de 0,01 mg/kg en todas las matrices.

### 3.3. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE FUNGICIDAS TRIAZÓLICOS EN MATRICES VEGETALES

Existen una amplia variedad de métodos publicados para la determinación de fungicidas triazólicos como miclobutanil en frutas, hortalizas y otras matrices usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, *gas chromatography coupled to mass spectrometry*)<sup>24</sup> y cromatografía de líquidos de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS, *high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry*)<sup>25</sup>. La separación enantiomérica de miclobutanil se puede obtener por electroforesis capilar (CE, *capillary electrophoresis*)<sup>26</sup>, por cromatografía electrocinética micelar (MEKC, *micellar electrokinetic chromatography*)<sup>27,28</sup> y por LC en fase normal/reversa con detección UV<sup>29,30</sup>. Sin embargo, los valores obtenidos de límites de detección (LOD, *limits of detection*) suelen ser modestos e insuficientes para el análisis de muestras reales por

CE. Se sabe que la técnica de CE sufre de baja sensibilidad cuando utiliza detección de UV debido a los volúmenes de inyección pequeños y a la longitud del camino óptico. Recientemente, se ha desarrollado un método para la separación de los enantiómeros de miclobutanil en aguas y suelos usando LC en fase normal y reversa con detección UV.<sup>31,32</sup> Sin embargo, no se logra alta especificidad y sensibilidad con esta técnica cuando se aplica a muestras de matrices complicadas. Por ello, el uso de LC acoplada a espectrometría de masas (MS) en tándem (MS/MS) es una alternativa eficaz que supera muchas de estas deficiencias.<sup>33</sup>

### 3.3.1. Métodos de extracción

Antes de llevar a cabo la determinación analítica es necesario tratar la muestra a fin de extraer los analitos de la matriz y, en su caso, eliminar los compuestos que interfieran. También es necesaria una etapa de preconcentración por la posibilidad de que los analitos se encuentren en cantidades traza. A la hora de seleccionar el método de extracción se debe tener en cuenta la naturaleza química de los analitos y de la matriz. Factores como el pH, contenido en agua de la muestra, disolvente utilizado y tiempo de agitación influyen en la eficacia de la extracción. Actualmente, se trabaja en encontrar métodos de extracción rápidos y eficaces. Los fungicidas triazólicos se extraen mediante la aplicación de métodos convencionales multi-residuo basados en la extracción QuEChERS (rápido, simple, barato, efectivo, robusto y seguro).<sup>34,35</sup>

El método QuEChERS<sup>36</sup> original se basa en mezclar 10 g de muestra con 10 ml de acetonitrilo; tras agitar la mezcla se le añaden las sales MgSO<sub>4</sub> anhidro (elimina agua) y NaCl (favorece el paso de los analitos a la fase orgánica). Tras centrifugar para la separación efectiva de las fases, se recoge la capa sobrenadante de acetonitrilo donde se encuentran los analitos y a continuación se realiza una etapa de limpieza mediante extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE, *dispersive solid phase extraction*) mezclando alícuotas del extracto con las sales MgSO<sub>4</sub> anhídrido y amina primaria secundaria (PSA, *primary secondary amine*), sorbente que permite la eliminación de interferentes polares, como pigmentos, azúcares o ácidos grasos. Finalmente el extracto obtenido se analiza por LC o GC.

El método QuEChERS ha sufrido modificaciones a lo largo de los años para adaptarse a las características de determinados analitos y matrices. Actualmente existen dos versiones oficiales, una denominada americana y otra europea. La versión americana pertenece a la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC,<sup>37</sup> *Association of Official Analytical Chemists*) cuyo desarrollo tuvo lugar en el año 2007. Esta versión emplea acetonitrilo con un 1 % de ácido acético como disolvente de extracción y acetato de sodio en lugar de cloruro de sodio como sal. La versión europea corresponde al Método Oficial Europeo EN15662<sup>38</sup> que utiliza tampón citrato y una mezcla de las sales sulfato de magnesio, cloruro de sodio, citrato de sodio dihidratado y citrato de sodio sesquihidratado.

En general la mayoría de los métodos publicados (Tabla 13) se basan en la extracción de un número reducido de fungicidas triazólicos, sin incluir metabolitos, mediante extracción QuEChERS. Así, Q. Tian y col.<sup>32</sup> han desarrollado un método para la determinación en agua y suelo de paclobutrazol y miclobutanil, tras extracción en fase

sólida con C<sup>18</sup> (en suelos previa adición de agua), obteniendo recuperaciones entre 83,1-98,1 en agua y en el intervalo de 82,4-95,2 en suelo. Los valores de precisión oscilaron en el rango 3,8-11,5%.

F. Dong y col.<sup>33</sup> desarrollaron un método QuEChERS con acetonitrilo y agua en el que determinaban metaflumizona en muestras de col y suelo. Usaron sulfato de magnesio y cloruro de sodio como sales de extracción y sulfato de sodio anhídrido y PSA como sales de limpieza. Se obtuvieron buenas recuperaciones de 77,6 – 84,7 en suelo y 79,0 – 87,9 en col. La precisión osciló entre 3,5 – 7,9 %.

A.B. Bordin y col.<sup>34</sup> llevaron a cabo un método QuEChERS con acetonitrilo y agua en el que determinaban 37 plaguicidas, entre ellos ciproconazol y tebuconazol, en harina de trigo. Utilizaron sulfato de magnesio, acetato de sodio y citrato de sodio sesquihidratado como sales de extracción. No se utilizaron sales de limpieza. Se obtuvieron recuperaciones de 34,0 – 117,8 % y una precisión de 5,7 – 54,6 %.

Zhang y col.<sup>39</sup> desarrollaron un método QuEChERS para cuantificar los enantiómeros de triticonazol en muestras de pepino, tomate, pera, col, manzana y suelo. Como sales de extracción usaron sulfato de magnesio anhídrido y acetato de sodio, mientras que como sales de limpieza utilizaron PSA, carbón negro grafitizado (GCB, graphitized carbon black) y sulfato de magnesio anhídrido. Obtuvieron excelentes recuperaciones entre 84,1 % – 103,2 % y la desviación estándar relativa se situaba entre 1,7 % - 8,4 %. En otro estudio, H. Zhang y col.<sup>40</sup> desarrollaron un método para la determinación de miclobutanil y fenbuconazol en muestras de fresa. Los compuestos se extrajeron mediante QuEChERS utilizando acetonitrilo con un 1 % de ácido acético junto con sulfato de magnesio y acetato de sodio. En la etapa de limpieza usaron PSA y C<sub>18</sub>. Se obtuvieron buenas recuperaciones entre 82,6 – 91,5 % para fenbuconazol y entre 82,1 – 92,9 % para miclobutanil. La precisión fue inferior al 5,4 % para ambos analitos.

F. Dong y col.<sup>41</sup> aplicaron un método QuEChERS usando como disolvente acetonitrilo para determinar miclobutanil en muestras de pepino y suelo. Usaron MgSO<sub>4</sub> y NaCl como sales de extracción, realizando una etapa de limpieza empleando GCB y C<sub>18</sub>. Se obtuvieron buenas recuperaciones entre 77,6 – 117,0 % y una precisión inferior al 8,8 %.

Y. Li y col.<sup>42</sup> desarrollaron otro método QuEChERS usando como disolvente agua y acetonitrilo para la determinación de tebuconazol en muestras de tomate, pepino, pera, manzana y suelo. Emplearon sulfato de magnesio y cloruro de sodio como sales de extracción y PSA, C<sub>18</sub>, GCB (exceptuando las muestras de suelo) y sulfato de magnesio anhídrido como sales de limpieza. Obtuvieron recuperaciones entre 79,3 – 101,1 %, una precisión intra-día entre 2,8 – 11,5 % y una precisión inter-día entre 4,1 – 8,6 %.

X. Chen y col.<sup>43</sup> desarrollaron un método QuEChERS usando como disolvente acetonitrilo para la determinación de tetraconazol y kresoxim-metil en fresas de invernadero. Utilizaban sulfato de magnesio y cloruro de sodio como sales de extracción y PSA, sulfato de magnesio anhídrido y nanotubos de carbono durante la etapa de limpieza. Las recuperaciones oscilaban entre 90,6 – 107,0 % y la desviación estándar relativa entre 2,4 – 9,5 %.

**Tabla 13.** Resumen de los métodos de extracción publicados\*.

Compuestos	Matriz	Extracción	Recuperación (%)	Precisión (%)	Referencia
Paclobutrazol miclobutanil	Agua y suelo	Fase sólida	82,4-95,2	3,8 – 11,5	31
Metaflumizona	Col y suelo	QuEChERS con ACN y agua	77,6–87,9	3,5 – 7,9	32
Varios plaguicidas (2 triazólicos)	Harina de trigo	QuEChERS con ACN 1 % AcOH	34,0 – 117,8	5,7 – 54,6	34
Enantiómeros de triazol y triticonazol	Pepino, tomate, pera, col, manzana y suelo	QuEChERS con ACN	84,1 – 103,2	1,7 - 8,4	39
Miclobutanil y fenbuconazol	Fresa	QuEChERS con ACN 1 % AcOH	82,1– 92,9	<5,4	40
Miclobutanil	Pepino y suelo	QuEChERS con ACN	77,6 – 117,0	8,8	41
Tebuconazol	Tomate pepino, pera, manzana suelo	QuEChERS con agua y ACN	79,3 – 101,1	2,8 – 11,5 (intra) 4,1 – 8,6 (inter)	42
Tetraconazol y kresoxim-metil	Fresa	QuEChERS con ACN	90,6 – 107	2,4 – 9,5	43
Protioconazol y protioconazol-desthio	Pepino, pera y suelo	QuEChERS con ACN	71,8 - 102,0	0,3 - 11,9 (intra) 0,9 - 10,6 (inter)	44
Varios triazólicos	Pepino	Extracción en fase sólida	82,3 – 117,6	11,8	45
Difenoconazol, propiconazol y piraclostrobina	Pimiento y suelo	QuEChERS con ACN	79,6 – 103,1 difenoconazol, 85,9 – 103,3 propiconazol 80,1 – 97,7 piraclostrobina	6,5	46
1,2,4-triazol	Suelo	QuEChERS con agua milliQ	83 – 97	7,8	48

(\*) Abreviaturas: ACN: Acetonitrilo; AcOH: Ácido Acético

Z. Zhang y col.<sup>44</sup> desarrollaron otro método para la determinación de protioconazol y su metabolito principal protioconazol-desthio en muestras de pepino, pera y suelo usando como disolvente acetonitrilo. Tras agitación se añadía cloruro de sodio, se volvía a agitar y se separaba el sobrenadante de acetonitrilo, el cual se llevaba a

sequedad. Los extractos se disolvían en *n*-hexano y se sometían a limpieza mediante cartuchos de SPE de Florisil, usando una mezcla de *n*-hexano/acetona (98:2, v/v) para eluir el metabolito y de *n*-hexano/acetona (75:25, v/v) para eluir el protioconazol. Seguidamente los extractos obtenidos se llevaban a sequedad y se redisolvían en acetonitrilo antes de su análisis. Las recuperaciones obtenidas oscilaban entre 71,8 - 102,0 %, la desviación estándar relativa intradía entre 0,3 - 11,9 % y la desviación estándar relativa interdía entre 0,9 - 10,6 %.

F. Zhao y col.<sup>45</sup> desarrollaron un método para la determinación de 20 fungicidas triazólicos en muestras de pepino basado en una extracción en fase sólida con polímeros específicos impresos molecularmente (MIP, *Molecularly Printed Polymer*) como adsorbentes. Las recuperaciones obtenidas estaban en el rango 82,3 - 117,6 %, con una desviación estándar relativa inferior al 11,8 %.

S. Wu y col.<sup>20</sup> desarrollaron otro método para determinar difenoconazol, propiconazol y piraclostrobina en muestras de pimiento y suelos. Los fungicidas se extrajeron con acetonitrilo junto con MgSO<sub>4</sub> y NaCl. La limpieza se realizó mediante d-SPE utilizando PSA. Las recuperaciones se hallaban entre 79,6 - 103,1 % para difenoconazol, 85,9 - 103,3 % para propiconazol y 80,1 - 97,7 % para piraclostrobina. La desviación estándar relativa fue inferior al 6,5 % en todos los casos.

Sin embargo para la extracción de los metabolitos, como los TDMs, se requieren métodos específicos. Así, el Laboratorio de Referencia Europeo (EURL, *EU Reference Laboratory*) ha desarrollado el método "Extracción Rápida de Plaguicidas Polares", (QuPPE,<sup>46</sup> *Quick Polar Pesticides*), basado en la extracción de los compuestos de interés de la muestra con metanol acidificado, siendo dicho procedimiento utilizado para los metabolitos. En el método propuesto, la cuantificación se realiza mediante la utilización de patrones marcados isotópicamente, compensando de esta manera el posible efecto matriz, pero éstos no están comercialmente disponibles, y por lo tanto, no están accesibles para la mayoría de los laboratorios de ensayo ni de investigación. Para la extracción de 1,2,4-triazol de suelos también se ha propuesto la extracción con agua<sup>47</sup>, no habiéndose evaluado hasta la fecha la eficacia del método QuPPE para la extracción simultánea de fungicidas triazólicos y TDMs.

En resumen, existen muy pocos métodos que permitan la extracción cuantitativa de TDMs, cuyo comportamiento es muy diferente al de los fungicidas triazólicos padre. Además la alta selectividad requerida para monitorizar los residuos de estos plaguicidas a bajos niveles en algunas matrices presenta un gran desafío porque es difícil su separación de otros compuestos interferentes. Por lo tanto, existe la necesidad del desarrollo de métodos de extracción de fungicidas triazólicos y sus metabolitos a bajos niveles de concentración en muestras vegetales.<sup>13</sup>

### 3.3.2 Análisis mediante técnicas cromatográficas

Respecto a la determinación analítica (Tabla 14), aunque la mayoría de los estudios han utilizado LC-MS, hay trabajos que han empleado GC acoplada a detectores convencionales (detector de captura electrónica)<sup>48</sup>, aunque una reciente publicación ha demostrado las altas capacidades que presenta la cromatografía de fluidos supercríticos acoplada al analizador de triple cuadrupolo (QQQ, *triple quadrupole*) para la



determinación de fungicidas triazólicos y sus metabolitos<sup>36</sup>. De forma general, cuando se emplea LC-MS, el analizador más utilizado ha sido QqQ,<sup>34</sup> aunque también se ha empleado un analizador híbrido cuadrupolo-trampa de iones (QTRAP).<sup>44</sup> Asimismo, el analizador de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS, *high resolution mass spectrometry*) de tiempo de vuelo (TOF, *Time of Flight*) ha sido usado para la identificación tentativa de nuevos metabolitos de tebuconazol por degradación de *Bacillus sp. 3B6*;<sup>49</sup> pero no se ha utilizado para la determinación de TDMs o para la caracterización de otros metabolitos del resto de fungicidas triazólicos.

El analizador de QqQ, aunque es el más utilizado, presenta ciertas debilidades en la determinación de los TDMs, debido a sus bajos pesos moleculares y escasos iones de confirmación, así como a posibles interferencias cromatográficas, por lo que el empleo de la HRMS se convierte en una poderosa alternativa para mejorar la selectividad de la determinación de estos compuestos. Es de resaltar que el empleo de este tipo de analizadores presenta ventajas respecto a los de baja resolución, debido al incremento de la selectividad en la monitorización de los iones seleccionados. Así, puede lograrse una “separación” espectral entre los compuestos originales y posibles interferencias cromatográficas o espectrales, que no pueden lograrse si se emplean analizadores de baja resolución a causa de la similitud en las relaciones masa/carga ( $m/z$ ) de los iones monitorizados y su insuficiente capacidad discriminativa.<sup>50</sup> Otra ventaja adicional es que a la hora del proceso de identificación, a causa del bajo peso molecular de los TDMs, a veces es difícil conseguir dos iones producto lo suficientemente selectivos, mientras que mediante el empleo de la HRMS, la monitorización del ion característico (normalmente  $[M+H]^+$ ) y de un fragmento con un error de masa inferior a 5 ppm,<sup>51</sup> permite la identificación fiable de este tipo de compuestos.

Sin embargo, en el presente estudio se ha aplicado la LC acoplada a un analizador de QqQ a fin de evaluar su potencialidad en la determinación simultánea de 8 fungicidas triazólicos progenitores y el metabolito común a todos ellos 1,2,4-triazol.

En los trabajos publicados donde se usa LC se utilizan diferentes tipos de fases estacionarias (Tabla 14). Q. Tian y col.<sup>32</sup> separaron y determinaron los enantiómeros de paclobutrazol y miclobutanil en muestras de agua y suelo por medio de LC-UV utilizando una fase estacionaria de celulosa tris-3,5-dimetilfenil carbamato. El valor de LOD quedó fijado a 0,0015  $\mu\text{g/ml}$  para agua y 0,012  $\mu\text{g/g}$  para suelo.

F. Dong y col.<sup>33</sup> determinaron metaflumizona en muestras de col y suelo mediante cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia (UHPLC, *ultra high performance liquid chromatography*) acoplada a MS/MS usando QqQ como analizador. Utilizaron una columna con fase estacionaria C<sub>18</sub>. El límite de cuantificación (LOQ, *limit of quantification*) estimado para ambos compuestos fue de 0,004 mg/kg.

A. B. Bordin y col.<sup>34</sup> cuantificaron 37 plaguicidas, entre ellos dos triazólicos, en muestras de harina de trigo utilizando UHPLC-MS/MS con analizador de QqQ. Usaron una fase estacionaria de XR-ODS II. El LOQ quedó fijado a 10,0  $\mu\text{g/kg}$ .

Q. Zhang y col.<sup>39</sup> separaron los enantiómeros de triticonazol en muestras de pepino, tomate, pera, col, manzana y suelo mediante LC-UV utilizando una fase estacionaria de celulosa tris (3-cloro-4-metilfenilcarbamato). Los LODs oscilaban entre 0,0012 –

0,0031 mg/kg y los LOQs entre 0,0036 – 0,0091 mg/kg, valores inferiores a los MRLs establecidos en Japón.

H. Zhang y col.<sup>40</sup> determinaron fenbuconazol y miclobutanil en muestras de fresa mediante LC-MS/MS con analizador de QqQ. Para ello utilizaron una fase estacionaria de celulosa tris (3,5-dimetilfenilcarbamato), estableciendo los valores de LOD en 0,6 µg/kg y de LOQ en 2 µg/kg para ambos compuestos.

F. Dong y col.<sup>41</sup> determinaron los enantiómeros de miclobutanil en muestras de pepino y suelo mediante LC-MS/MS con analizador de QqQ utilizando una columna Chiralcel OD-RH, cuya fase estacionaria es similar a la del estudio anterior, celulosa tris (3,5-dimetilfenilcarbamato). El límite de detección LOD se fijó en 0,8 µg/kg para pepino y 1,0 µg/kg para suelo, mientras el LOQ se estableció en 3,0 µg/kg en pepino y 3,5 µg/kg en suelo.

Y. Li y col.<sup>42</sup> determinaron tebuconazol en muestras de tomate, pepino, pera, manzana y suelo utilizando UHPLC-MS/MS con analizador de QqQ utilizando una columna *Lux 3u Amylose-2*, cuya fase estacionaria está compuesta de amilosa tris (5-cloro-2-metilfenilcarbamato). El LOD fue igual o inferior a 0,6 µg/kg y el LOQ igual o inferior a 2,0 µg/kg en todas las matrices.

X. Chen y col.<sup>43</sup> determinaron tetraconazol y kresoxim-metil en muestras de fresa por medio de LC-QqQ-MS/MS utilizando una fase estacionaria de C<sub>18</sub>. Se obtuvieron valores de LOD de 0,68 µg/kg para tetraconazol y de 1,7 µg/kg para kresoxim-metil, mientras que el LOQ fue de 5,0 µg/kg para ambos compuestos

Z. Zhang y col.<sup>44</sup> llevaron a cabo la determinación de protioconazol y de su metabolito protioconazol-destio en muestras de pepino, pera y suelo mediante UHPLC-MS/MS con analizador QTRAP utilizando la columna *LuxCellulose-3*, cuya fase estacionaria es celulosa tris (4-metilbenzoato). Los LODs oscilaron entre 0,0031-0,0087 µg/kg y los LOQs entre 0,0102-0,0290 µg/kg para protioconazol. Para su metabolito el LOD se estableció en el rango entre 0,0025-0,0075 µg/kg y el LOQ entre 0,0083-0,025 µg/kg.

F. Zhang y col.<sup>45</sup> determinaron 20 fungicidas triazólicos en muestras de pepino utilizando cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC, *high performance liquid chromatography*)-MS/MS con analizador de QqQ con una fase estacionaria de C<sub>18</sub>. Los valores de LOD estuvieron en el rango de 0,05-0,40 µg/kg.

S. Wu y col.<sup>20</sup> detectaron difenoconazol, propiconazol y piraclostrobina en muestras de pimiento y suelo por medio de LC-MS/MS con analizador QTRAP utilizando una fase estacionaria de C<sub>18</sub>. Los valores de LOD y de LOQ se fijaron para las dos matrices en 0,0015 y 0,005 mg/kg respectivamente.

A. Blondel y col.<sup>47</sup> determinaron 1,2,4-triazol en muestras de suelo mediante LC-MS/MS con analizador QTRAP. Para ello utilizaron una fase estacionaria de carbón gratificado poroso (PGC, *Porous Graphitic Carbon*). El LOQ fijado fue de 4,0 µg/kg.

**Tabla 14.** Resumen de las técnicas analíticas publicadas para los fungicidas triazólicos\*.

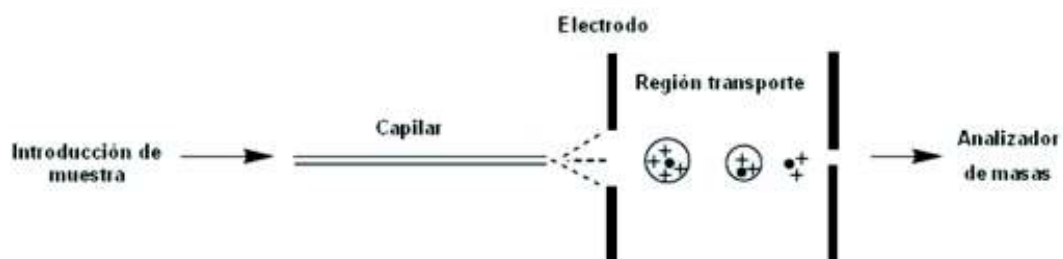
Compuestos	Matriz	Técnica de análisis	Fase estacionaria	LOQ (µg/kg)	Referencia
Paclobutrazol y miclobutanil	Agua y suelo	LC-UV	Celulosa tris-3,5-dimetilfenil carbamato	0,0025 (µg/ml) (agua) 0,020 (µg/g) (suelo)	31
Metaflumizona	Col y suelo	UHPLC-MS/MS	C <sub>18</sub>	0,004 (mg/kg)	32
Varios plaguicidas (fungicidas triazólicos incluidos)	Harina de trigo	LC-MS/MS	Shim-pack XR-ODS II	10,0	34
Enantiómeros de triazol triticonazol	Pepino, tomate, pera, col, manzana y suelo	HPLC-UV	Celulosa tris (3-cloro-4-metilfenilcarbamato)	3,6–9,1	39
Miclobutanil y fenbuconazol	Fresa	HPLC-MS/MS	Celulosa tris (3,5-dimetilfenilcarbamato)	2,0	40
Miclobutanil	Pepino y suelo	HPLC-MS/MS	Celulosa tris (3,5-dimetilfenilcarbamato)	2,0 – 3,5	41
Tebuconazol	Tomate, pepino, pera, manzana y suelo	HPLC-MS/MS	Amilosa tris (5-cloro-2-metilfenilcarbamato).	<2,0	42
Tetraconazol y kresoxim-metil	Fresa	LC-QqQ-MS/MS	C <sub>18</sub>	5,0	43
Protioconazol y protioconazol-desthio	Pepino, pera y suelo	UHPLC-MS/MS	Celulosa tris (4-metilbenzoato)	0,0102–0,0290 (protioconazol) y 0,0083–0,025 (protioconazol-desthio)	44
Varios triazólicos	Pepino	HPLC-MS/MS	C <sub>18</sub>	0,05-0,4 (LOD)	45
Difenoconazol, propiconazol y piraclostrobina	Pimiento y suelos	LC-MS/MS	C <sub>18</sub>	1,5	46
1,2,4-triazol	Suelo	LC-MS/MS	PGC	4,0	48

(\*) Abreviaturas: HPLC: Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia; LC: Cromatografía de Líquidos; LOD: Límite de Detección; LOQ: Límite de cuantificación; MS: Espectrometría de masas; PGC: Carbón Gratificado Poroso; QqQ: Triple cuadrupolo; UHPLC: Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Eficacia; UV: Ultravioleta.

### 3.3.3 Espectrometría de masas

La MS es una técnica de análisis que permite la determinación cuantitativa y cualitativa de un gran número de compuestos orgánicos, entre ellos los plaguicidas. Todos los espectrómetros de masas constan de tres elementos principales que son: la fuente de ionización, el analizador de masas y el detector,<sup>52</sup> que se comentan a continuación.

- Fuente de ionización. Se realiza la ionización de los analitos que provienen del sistema cromatográfico. En LC las dos fuentes de ionización principales trabajan a presión atmosférica y son electronebulización (ESI, *Electrospray*) e ionización química a presión atmosférica (APCI, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*). En este trabajo se ha utilizado la ionización por ESI (Figura 2). En esta modalidad, la muestra, generalmente disuelta en un disolvente polar, entra mediante un capilar recubierto de una superficie metálica cargada positivamente y rodeado de un flujo coaxial de un gas nebulizador (helio o nitrógeno), formándose un aerosol de microgotas cargadas en el extremo de dicho capilar. El aerosol es transportado mediante el flujo de gas hasta el analizador de masas, y en el trayecto las gotas se van haciendo cada vez más pequeñas, el disolvente se va evaporando, quedando finalmente los iones de la muestra. Los iones positivos originados son acelerados por placas de alto potencial negativo hasta llegar al detector.

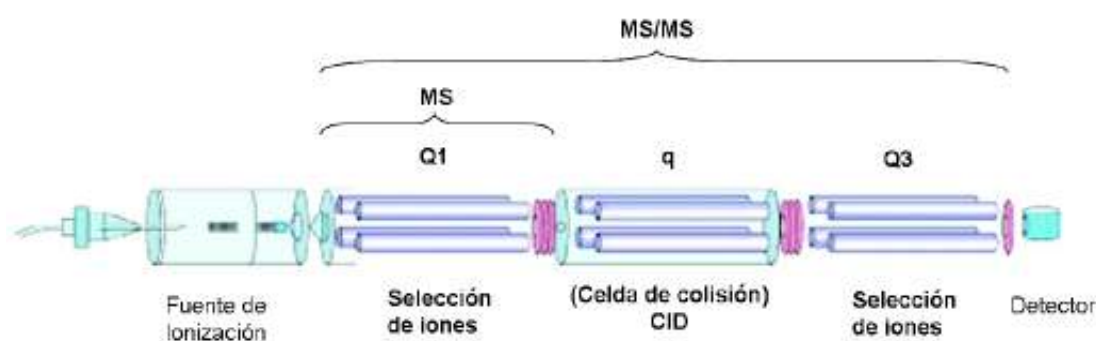


**Figura 2.** Esquema del método de ionización por electroespray.<sup>53</sup>

- Analizador de masas. Su función es separar y analizar la mezcla de iones generados en la etapa anterior en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ). Se pueden diferenciar dos tipos de analizadores de masas, los de baja resolución en los que la relación  $m/z$  se aproxima hasta el número entero más cercano y los de alta resolución que aproximan dicha relación hasta la cuarta o quinta cifra decimal.
- Detector. Su función es realizar la medida y amplificación de la corriente de iones ya separados según su relación  $m/z$ , siendo el electromultiplicador el detector más utilizado. La representación de la corriente total de iones detectada constituye el cromatograma de iones totales (TIC, *Total Ion Chromatogram*).

Los analizadores de cuadrupolo son los más usados en el análisis de contaminantes por su alta sensibilidad, su baja complejidad y bajo coste, destacando el de QqQ (Figura 3). Dicho analizador consiste en tres cuadrupolos conectados en serie, denominándose al segundo cámara de colisión. El primer cuadrupolo (Q1) selecciona los iones precursores de interés que pasan al segundo cuadrupolo. En la cámara de colisión (segundo cuadrupolo, q) esos iones son fragmentados por un gas inerte, como el nitrógeno o el argón. Finalmente los iones producto formados pasan al tercer cuadrupolo (Q3) donde se seleccionan los iones producto deseados que se transferirán al detector donde se registrará el correspondiente espectro de masas.

A pesar de no ser analizadores de alta resolución, las características antes mencionadas del QqQ lo convierten en la mejor opción para el análisis rutinario de contaminantes llevado a cabo en cualquier laboratorio.



**Figura 3.** Representación de un analizador de triple cuadrupolo.<sup>54</sup>

### 3.4. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La Guía Sante<sup>51</sup> define la validación del método analítico como “un requisito de los organismos de acreditación que debe ser compatible y ampliado mediante la verificación del rendimiento del método durante el análisis de rutina (control de calidad analítico y validación de métodos en curso)”. Se ha utilizado este documento para realizar la validación del método desarrollado en este trabajo.

Otra definición de validación<sup>55</sup> es "el proceso para definir un requisito analítico, y la confirmación de que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas" según el documento "*The Fitness for Purpose of Analytical Methods*" (EURACHEM, 2016).

Para cumplir ambas definiciones de validación, se deben estimar una serie de parámetros de validación. Existen tres normas importantes que Massart<sup>56</sup> denominó "las reglas de oro de la validación" para llevar a cabo una validación correcta del método analítico.

- Validar todo el proceso analítico en su conjunto incluida la etapa de tratamiento de la muestra, ya que la manipulación de la muestra puede afectar a la exactitud y precisión del método.
- Validar todo el rango de concentraciones en las que se aplica el método.
- Validar el método para todas las matrices en las que se aplique.

En la Tabla 15 aparecen los parámetros de validación que son utilizados por la Guía Sante<sup>51</sup> y por Eurachem<sup>55</sup>.

**Tabla 15.** Tabla comparativa de los parámetros de validación utilizados por la Guía Sante y por Eurachem\*.

Parámetro	Guía Sante	Eurachem
Linealidad	x	x
Efecto matriz	x	
LOQ	x	x
LOD		x
Especificidad	x	
Selectividad		x
Veracidad	x	x
Precisión	x	x
Robustez	x	x
Incertidumbre	x	x
Intervalo de trabajo del instrumento		x

(\*) Abreviaturas: LOD: Límite de Detección; LOQ: Límite de Cuantificación.

Los parámetros de validación principales son los siguientes:

**Linealidad:** es la capacidad de un método para producir resultados proporcionales a la concentración del analito en la muestra.

**Efecto matriz:** es el efecto que producen los componentes de la muestra diferentes al analito. Se calcula preparando una serie de patrones en el disolvente utilizado en la extracción y otra serie de patrones en el extracto de la matriz de la muestra añadiendo concentraciones conocidas y crecientes de analito. Se comparan las pendientes de las rectas obtenidas mediante la siguiente fórmula:  $((\text{pendiente matriz}/\text{pendiente disolvente})-1) \times 100$ . El resultado no debe superar el  $\pm 20$  % según la Guía Sante.

**Exactitud (veracidad):** es el grado de concordancia entre el valor medio de una serie de medidas y su valor real. Se expresa como porcentaje de recuperación. La Guía Sante considera aceptables los valores comprendidos entre 70 -120 %.

**Precisión:** es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el mismo método analítico en diferentes alícuotas de la muestra. Se expresa mediante desviación estándar relativa (RSD, *Relative Standard Deviation*) en %. La Guía Sante<sup>51</sup> no acepta un valor superior al 20 %. Existen tres formas de medir la precisión:

- **Precisión intra-día (repetibilidad):** corresponde a estudios de precisión llevados a cabo en las condiciones más favorables (mismo laboratorio, mismos reactivos, patrones e instrumentos, condiciones ambientales, mismo día, mismo analista,...).

- Precisión inter-día (precisión intermedia): corresponde a estudios de precisión llevados a cabo a lo largo del tiempo en un mismo laboratorio, pudiendo por tanto reflejar diferencias en las condiciones ambientales, analista, instrumentos, patrones u otros reactivos que se usen en el método.
- Reproducibilidad: corresponde a estudios de precisión llevados a cabo en al menos dos laboratorios diferentes, y pudiendo reflejar por tanto diferencias entre analistas, instrumentos, condiciones ambientales, reactivos, patrones, ...

Incertidumbre: indica la desviación de los resultados provocada por errores en la medida. Se representa con el símbolo U. El resultado se suele expresar como concentración  $\pm U$ .

Límite de detección (LOD): es la concentración más baja de analito que se puede detectar con el método. Si se usa para su estimación el criterio de la relación señal/ruido (S/N), el LOD corresponde a aquel valor de concentración cuya señal presente un valor de  $S/N \geq 3$ .

La Guía Eurachem lo estima mediante el cálculo de  $3 \times s_0$ :

$$s_0 = \frac{s_0}{\sqrt{N}} \quad (\text{ecuación 1})$$

donde  $s_0$  representa la desviación estándar de los resultados y N el número de medidas replicadas.

Límite de cuantificación (LOQ): es la menor concentración que proporciona adecuados valores de veracidad (estudios de recuperación) y de precisión (expresada como RSD) según la definición de la Guía Sante. Si se usa el criterio de la relación S/N, el LOQ corresponde a aquel valor de concentración cuya señal presente un valor de  $S/N \geq 10$ .

La Guía Eurachem lo estima mediante el cálculo de  $k_Q \times s_0$  cuyo valor del multiplicador ( $k_Q$ ) suele ser 10 aunque se usan comúnmente otros valores como 5 ó 6.

Robustez: es una medida de la capacidad de un método de análisis para que no sea afectado por pequeños cambios en los valores de las variables experimentales del método (temperatura columna, concentración de reactivos, tiempo de extracción, flujo y composición de la fase móvil en cromatografía, etc...).

Especificidad: según la Guía Sante expresa que la respuesta del método se debe a un determinado analito. Para ello se utilizan blancos de matriz para comprobar que no hay interferencias con dicho analito.

Selectividad: es la capacidad de un método para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar según definición de Eurachem.

#### 4. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es el desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de los fungicidas triazólicos: ciproconazol, difenoconazol, fenbuconazol, miclobutanil, penconazol, tebuconazol, triadimenol y propiconazol, así como el metabolito 1,2,4-triazol, en frutas y hortalizas como: fresa, uva, calabacín, pimiento y tomate mediante LC-MS/MS.

Para ello se han llevado a cabo las siguientes tareas:

- Desarrollo de un método instrumental para la determinación de los 9 compuestos mediante LC-MS/MS utilizando un analizador de triple cuadrupolo.
- Aplicación de un método de extracción basado en el procedimiento QuEChERS para la separación de los compuestos triazólicos del resto de componentes de la matriz.
- Validación del método analítico mediante el cálculo de los parámetros: linealidad, efecto matriz, veracidad, precisión, LOD y LOQ.
- Aplicación del método validado al análisis de muestras reales de fresa, uva, calabacín, pimiento y tomate.

#### 5. MÉTODOS EXPERIMENTALES

##### 5.1. REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPOS UTILIZADOS

###### 5.1.1. Reactivos

Se utilizaron patrones analíticos de los fungicidas ciproconazol, difenoconazol, fenbuconazol, miclobutanil, penconazol, tebuconazol, triadimenol y propiconazol, así como del metabolito 1,2,4-triazol, de pureza > 99,9% de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). Se emplearon como disolventes metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN), ácido fórmico y ácido acético (AcOH) de la marca Honeywell (Morriston, NJ, EE.UU.). La fase móvil estaba compuesta de una disolución acuosa de ácido fórmico 0,1 % (Sigma-Aldrich) y MeOH. El agua ultrapura fue obtenida mediante un sistema de purificación de agua MilliQ de la marca Millipore (Bredford, MA, EE.UU.). Los reactivos utilizados fueron sulfato de magnesio anhidro (MgSO<sub>4</sub>), cloruro de sodio (NaCl), citrato de sodio (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>), dihidrogenocitrato de sodio (C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>7</sub>) y acetato de sodio (AcNa) de la marca Sigma-Aldrich de pureza > 99%.

###### 5.1.2. Materiales y equipos

Para la preparación y el tratamiento de las muestras se han utilizado: balanza analítica AB54-S/FACT (Mettler Toledo, Greifensee, Suiza), agitador vortex (Velp Scientifica, Usmate Velate, Italia) y una centrífuga de la marca Centronic-PL II de JP Selecta (Barcelona, España). Además, se emplearon filtros de nylon de 0,2 µm y viales de 1,5 ml de marca Agilent (Santa Clara, CA, EE.UU.).

Para el análisis cromatográfico, se utilizó un cromatógrafo de líquidos de la marca Agilent serie 1290 RRLC equipado con una bomba binaria (G4220A) y un



automuestreador termostático (G1330B). El cromatógrafo se acopló a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo de la marca Agilent (6460 A) con fuente de ionización por electrospray (G1958-65138). Se utilizó una columna Zorbax Plus C18 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm de tamaño de partícula) de la marca Agilent.

Para la optimización, caracterización y tratamiento de los datos se utilizó el software MassHunter de la marca Agilent.

## 5.2. PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES PATRÓN

Se prepararon disoluciones patrón de 1000 mg/l de cada uno de los compuestos en una disolución de MeOH/agua (50:50, v/v) en matraces de 25 ml. Se almacenaron en frascos topacio en el congelador en oscuridad a -20 °C. A partir de estas disoluciones, se prepararon disoluciones individuales de cada uno de los fungicidas a 10 mg/l, empleando como disolvente MeOH, y una disolución mezcla de todos los fungicidas a 10 mg/l también en MeOH, en matraces de 50 ml. Se mantuvieron también en oscuridad a -20 °C.

## 5.3. PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Para la validación del método se usaron muestras de fresa, uva, tomate, calabacín y pimiento obtenidas de un supermercado ecológico de Almería. Las muestras se trituraron con piel inmediatamente después de su llegada al laboratorio. A continuación, se recogieron porciones representativas, las cuales se almacenaron en bolsas de plástico herméticas y se guardaron en el frigorífico a 4° C hasta su análisis.

## 5.4. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

### 5.4.1. Método aplicado

Se utilizó el método de extracción QuEChERS en su versión original.<sup>36</sup> Para ello se siguió el siguiente procedimiento:

- Pesar 10 g de muestra en un tubo Falcon de 50 ml.
- Añadir 10 ml de ACN.
- Agitar en vortex durante un minuto.
- Añadir 4 g de MgSO<sub>4</sub> + 1 g de NaCl.
- Volver a agitar en vórtex durante un minuto.
- Centrifugar durante 10 minutos.
- Transferir el líquido sobrenadante y filtrar a un vial para su análisis por LC-MS/MS.

### 5.4.2. Otros métodos evaluados

#### a) Método QuEChERS versión europea<sup>37</sup>

- Pesar 10 g de muestra en un tubo Falcon de 50 ml.

- Añadir 10 ml de ACN.
- Agitar en vortex durante un minuto.
- Añadir 4 g de MgSO<sub>4</sub> + 1 g de NaCl + 1 g de citrato de sodio + 0,5 g dihidrógenocitrato de sodio.
- Volver a agitar en vórtex durante un minuto.
- Centrifugar durante 10 minutos.
- Transferir el líquido sobrenadante y filtrar a un vial para su análisis por LC-MS/MS.

#### **b) Método QuEChERS versión americana<sup>38</sup>**

- Pesar 10 g de muestra en un tubo Falcon de 50 ml.
- Añadir 10 ml de ACN acidificado con ácido acético (1 % v/v).
- Agitar en vortex durante un minuto.
- Añadir 4 g de MgSO<sub>4</sub> + 1 g de AcNa.
- Volver a agitar en vortex durante un minuto.
- Centrifugar durante 10 minutos.
- Transferir el líquido sobrenadante y filtrar a un vial para su análisis por LC-MS/MS.

#### **c) Método QuPPE<sup>46</sup>**

- Pesar 10 g de muestra en un tubo Falcon de 50 ml.
- Añadir 10 ml de MeOH acidificado con ácido fórmico (1 % v/v).
- Agitar en vórtex durante un minuto.
- Centrifugar durante 5 minutos.
- Transferir el líquido sobrenadante y filtrar a un vial para su análisis por LC-MS/MS.

### **5.5. CONDICIONES ESPECTROMÉTRICAS**

La temperatura del gas de la fuente y la temperatura del gas de secado fueron 300 °C y 350 °C respectivamente y sus flujos fueron 5 l/min y 11 l/min respectivamente.

La presión del nebulizador fue de 45 psi. El voltaje del capilar y del cono fueron de 3500 V y 500 V respectivamente. En la Tabla 16 se indican los parámetros espectrométricos óptimos determinados para cada analito.

**Tabla 16. Parámetros espectrométricos optimizados para los compuestos en estudio.**

<b>Analito</b>	<b>Ion precursor</b>	<b>Voltaje del fragmentor (V)</b>	<b>Iones producto*</b>	<b>Energía de colisión (eV)</b>	<b>Ion ratio</b>
<b>1,2,4-triazol</b>	70,1	50	<b>43,1</b>	21	8,9
			42,0	40	
<b>Miclobutanil</b>	289,1	150	<b>70,1</b>	17	30,7
			125,0	40	6,9
			151,0	25	2,4
			164,0	29	
<b>Tebuconazol</b>	308,2	138	<b>70,1</b>	25	8,9
			125,0	40	3,6
			151,0	25	3,2
			57,0	33	
<b>Penconazol</b>	284,1	130	<b>70,1</b>	17	69,1
			159,0	33	11,6
			173,0	17	5,3
			123,0	40	
<b>Triadimenol</b>	296,1	57	<b>70,1</b>	9	7,4
			43,0	40	5,9
			99,1	13	2,0
			57,0	40	
<b>Difenoconazol</b>	406,1	145	<b>251,0</b>	25	25,1
			337,0	13	14,2
			188,0	40	7,2
			223,0	40	
<b>Propiconazol</b>	342,1	140	<b>159,0</b>	40	87,3
			69,0	21	36,9
			41,0	40	9,6
			187,0	21	
<b>Ciproconazol</b>	292,1	75	<b>70,1</b>	17	34,8
			125,0	40	1,9
			139,0	25	1,9
			69,0	21	
<b>Fenbuconazol</b>	337,1	90	<b>70,1</b>	17	79,5
			125,0	40	9,7
			91,0	40	9,2
			194,0	13	

\* El ion en negrita se emplea durante el proceso de cuantificación.

## 5.6. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Se inyectaron 5 µl del extracto final y se realizó una separación cromatográfica usando el gradiente descrito en la Tabla 17. Se utilizó MeOH como disolvente A

(orgánico) y una disolución acuosa al 0,1% de ácido fórmico como disolvente B (acuoso).

**Tabla 17.** Gradiente de elución utilizado.

Tiempo (min)	% B
0,0	90
3,0	0
6,0	0
6,5	90
7,5	90

El flujo de fase móvil fue de 0,2 ml/min, el tiempo de análisis de 7,5 min y la temperatura de la columna de 30 °C.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

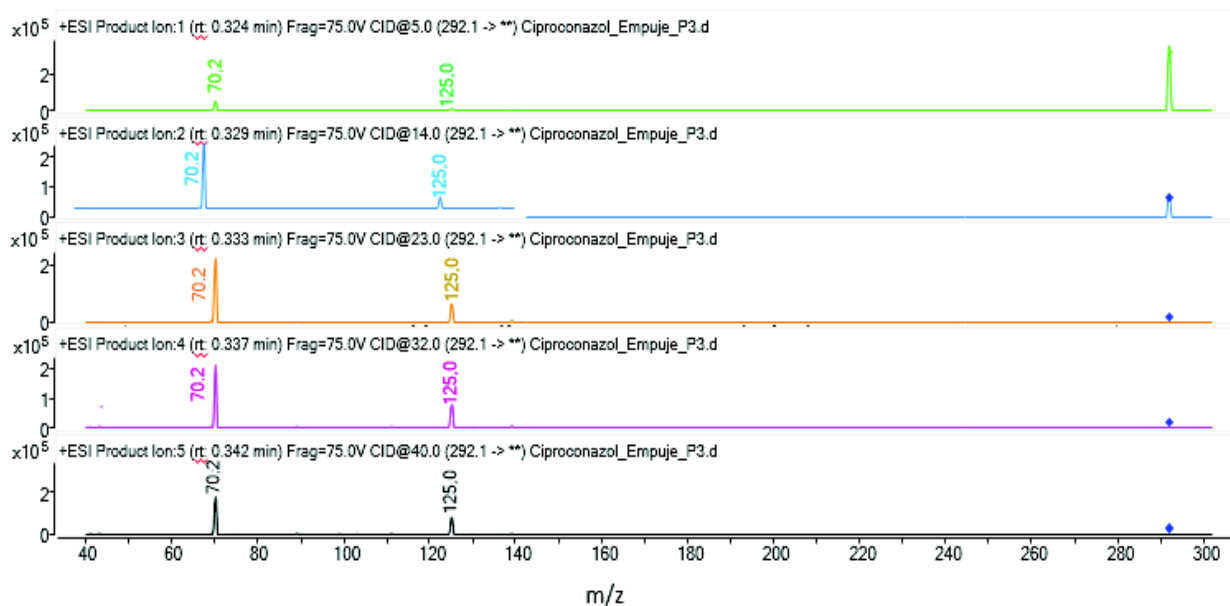
### 6.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS

#### 6.1.1. Optimización de las condiciones espectrométricas

Se realizó la optimización de las condiciones de trabajo MS/MS para cada uno de los analitos inyectando éstos de forma individualizada a una concentración de 10 mg/l y modificando tanto el voltaje del fragmentor, para la obtención del ion precursor, como la energía de colisión, para seleccionar los iones producto. A tal fin se llevó a cabo un análisis en barrido completo (*full scan*) con el que primero se optimizó el voltaje del fragmentor, variando el mismo entre 40 V y 160 V. La elección del voltaje óptimo se realizó usando como criterio el mínimo valor que proporcionaba la mayor sensibilidad de la señal para el ion precursor.

Después, se seleccionaron una serie de iones producto para cada analito, obtenidos a partir de los iones precursores, variando la energía de colisión entre 5 eV y 40 eV. Se seleccionaron cuatro iones producto con diferente energía de colisión para cada uno de los compuestos incluidos en este estudio, excepto para 1,2,4-triazol para el cual solo pudieron seleccionarse dos debido a su bajo peso molecular. El ion de mayor sensibilidad se seleccionó para fines cuantitativos y el resto para confirmar la presencia del compuesto. En la Tabla 16 se muestran los valores finalmente optimizados para cada compuesto.

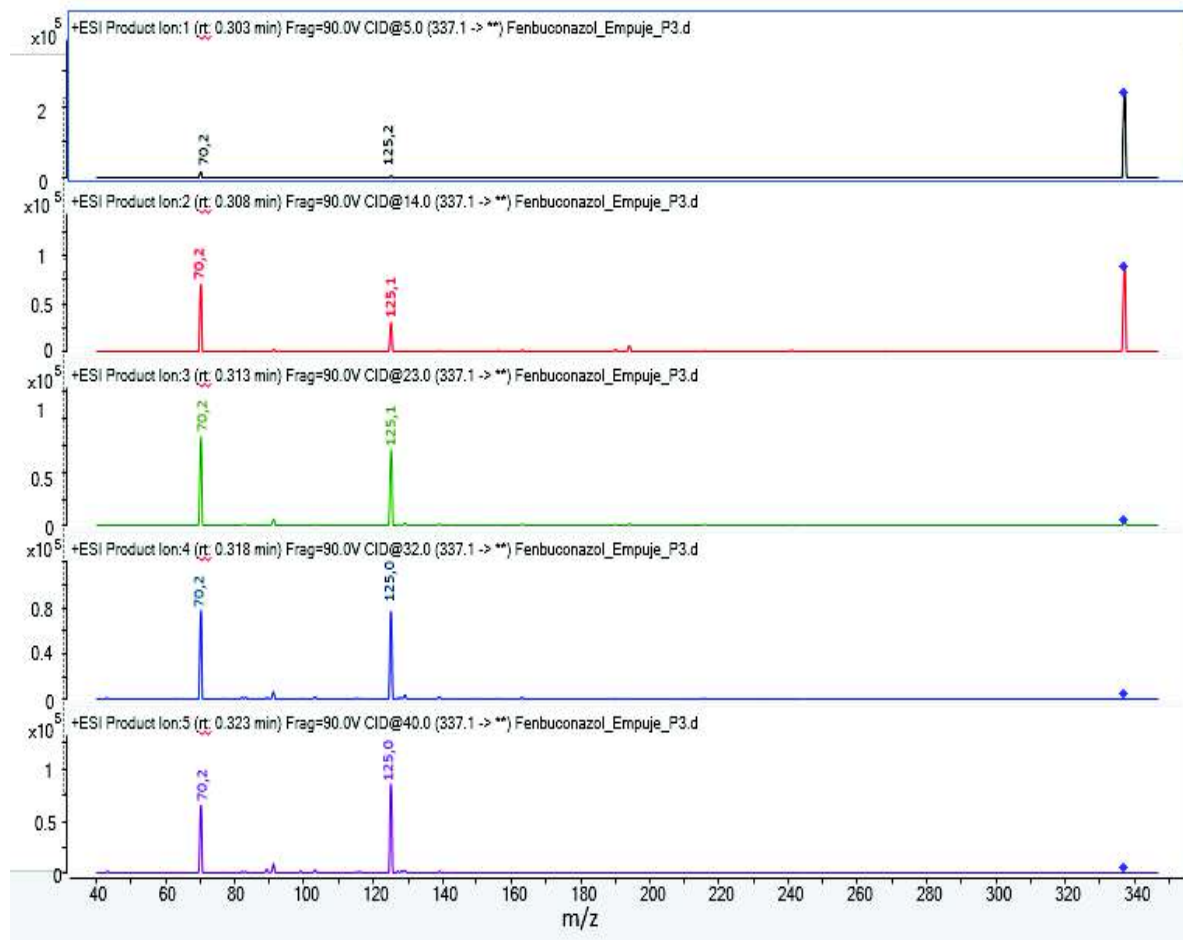
A modo de ejemplo en la Figura 4 se puede ver un espectro de masas de ciproconazol a su voltaje del fragmentor óptimo (75 V) donde se visualiza el ion producto de mayor sensibilidad, empleado para la cuantificación de este analito ( $m/z$ , 70) y el segundo ion de mayor sensibilidad utilizado para el proceso de confirmación ( $m/z$ , 125).



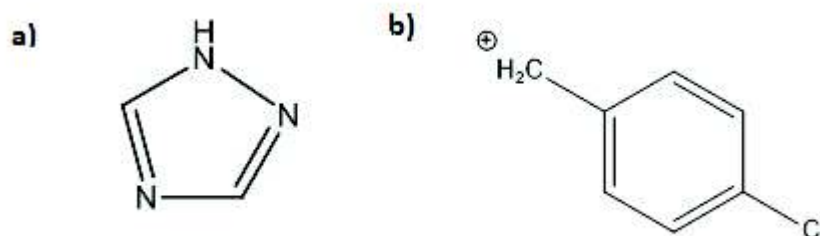
**Figura 4.** Espectro de masas de ciproconazol a voltaje del fragmentor óptimo (75 V).

De igual forma, en la Figura 5 se muestra el espectro de masas de fenbuconazol a su voltaje de fragmentor óptimo (90 V) donde se observa el ion producto de mayor sensibilidad utilizado durante el proceso de cuantificación ( $m/z$ , 70 eV) y el segundo ion de mayor sensibilidad empleado durante el proceso de confirmación ( $m/z$ , 125).

Como se puede observar en la Tabla 16, algunos iones producto son iguales para varios analitos. Esto se debe a que la estructura de estos compuestos es muy similar. Así, los iones de  $m/z$  70, que corresponden al fragmento protonado de 1,2,4-triazol<sup>57</sup> (Figura 6a), se monitoriza en los analitos miclobutanil, tebuconazol, penconazol, triadimenol, ciproconazol y fenbuconazol y  $m/z$  125, que corresponde al fragmento para-clorotolueno<sup>58</sup> cargado positivamente (Figura 6b), se detecta para miclobutanil, tebuconazol, ciproconazol y fenbuconazol.



**Figura 5.** Espectro de masas de fenbuconazol a voltaje de fragmentor óptimo (90 V).



**Figura 6.** Fragmentos correspondientes a  $m/z$  70 (a) y  $m/z$  125 (b).

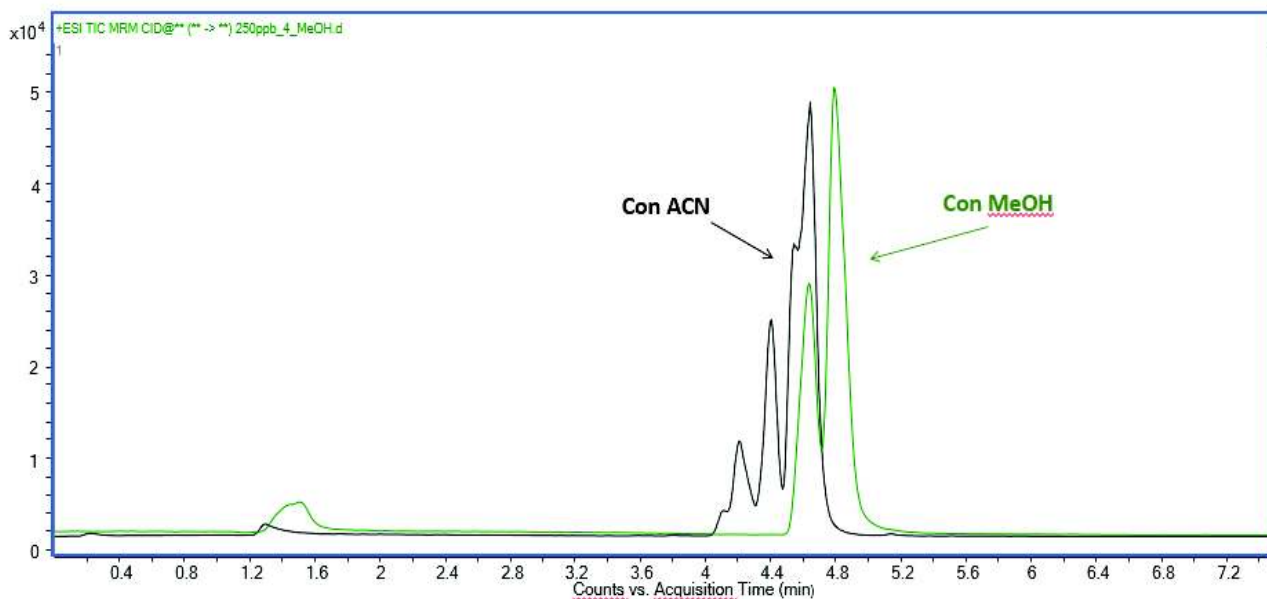
### 6.1.2. Optimización de las condiciones cromatográficas

Una vez establecidas las condiciones espectrométricas se procedió a la optimización de las condiciones cromatográficas. A tal fin se inició el estudio aplicando el gradiente de elución mostrado en la Tabla 18 y empleando distintas fases móviles. En primer lugar se estudió la influencia del disolvente orgánico, MeOH o ACN, (disolvente A) empleando como fase acuosa, una disolución acuosa de ácido fórmico al 0,1 % (disolvente B).

**Tabla 18.** Gradiente de fase móvil utilizado sin éxito.

Tiempo (min)	% B
0,0	90
5,0	0
7,0	0
7,5	90
8,0	90

Con MeOH, los analitos presentaban mayores tiempos de retención, mientras que con ACN los tiempos de retención eran algo menores, tal y como se puede observar en la Figura 7. El inconveniente de usar ACN como componente de la fase móvil, era que los analitos mostraban una menor sensibilidad, especialmente el 1,2,4-triazol (tiempo de retención 1.4 min). Por ello se decidió emplear MeOH como componente orgánico de la fase móvil.

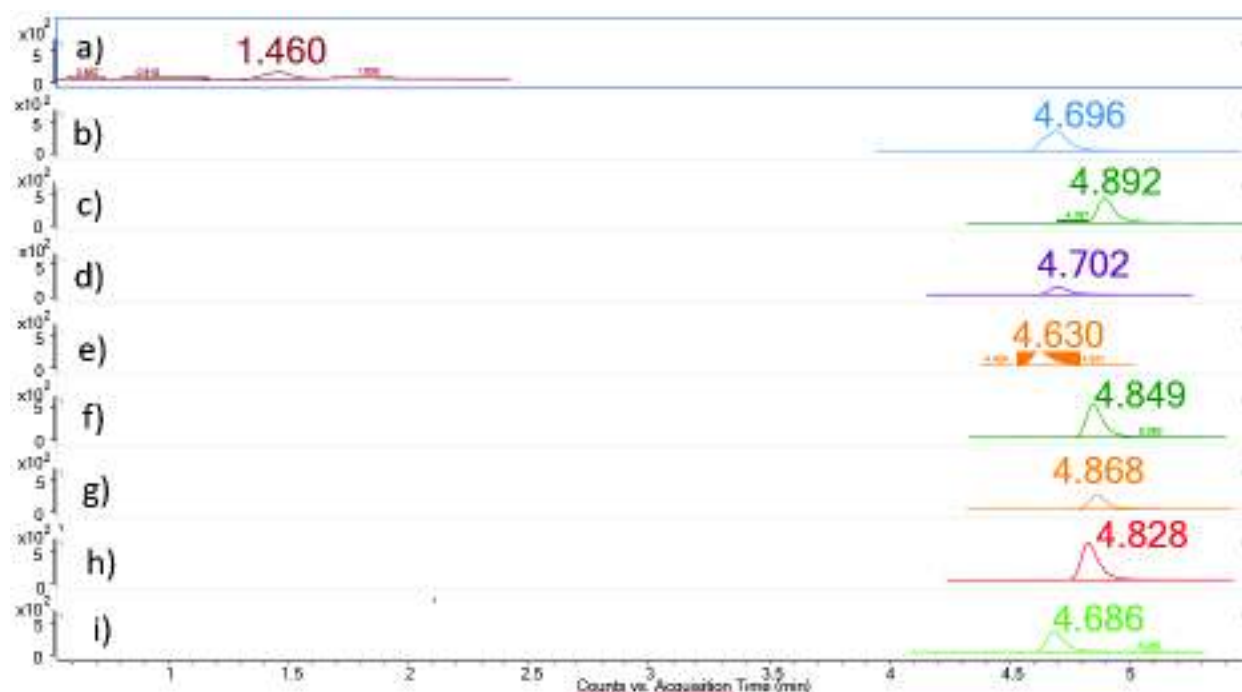


**Figura 7.** Comparativa entre los cromatogramas con MeOH y ACN utilizando el gradiente indicado en la Tabla 18.

Con objeto de reducir el tiempo de análisis se decidió modificar el gradiente de elución, empleando finalmente el indicado en la Tabla 17. En la Tabla 19 se muestra un resumen de los tiempos de retención y en la Figura 8 los cromatogramas iónicos extraídos para cada uno de los compuestos.

**Tabla 19.** Tiempos de retención correspondientes a los fungicidas empleando el gradiente indicado en la Tabla 17.

Analito	Tiempo de retención (min)
1,2,4-triazol	1,5
Ciproconazol	4,7
Difenoconazol	4,9
Fenbuconazol	4,7
Miclobutanil	4,5
Penconazol	4,7
Propiconazol	4,9
Tebuconazol	4,7
Triadimenol	4,6



**Figura 8.** Cromatogramas obtenidos de una disolución en metanol de 10  $\mu\text{g/l}$  utilizando el gradiente optimizado para los compuestos; 1,2,4-triazol (a), ciproconazol (b), difenoconazol (c), fenbuconazol (d), miclobutanil (e), penconazol (f), propiconazol (g), tebuconazol (h) y triadimenol (i).



Se puede observar que empleando estas condiciones, el metabolito principal de estos fungicidas, 1,2,4-triazol, eluye antes del minuto 2, mientras que el resto de compuestos presentan tiempos de retención comprendidos entre 4,7 y 4,9 minutos. A pesar de que los compuestos progenitores presentan tiempos de retención similares y que algunos iones producto son iguales, al tener distintos iones precursores, no hay interferencias entre ellos pudiéndose llevar a cabo su identificación y cuantificación sin error.

### 6.1.3. Optimización del proceso de extracción

Una vez optimizadas las condiciones instrumentales, se probaron tres procedimientos QuEChERS diferentes a fin de extraer los compuestos objeto de estudio de la matriz de tomate, además del método QuPPE<sup>46</sup>, descritos todos ellos en el apartado 5.4. En todos los casos se prepararon 3 fortificados a 100 µg/kg en un blanco de matriz de tomate. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 20, comentándose a continuación los principales resultados obtenidos.

**Tabla 20.** Valores de recuperación (y de RSD entre paréntesis) obtenidos a 100 µg/kg en las diferentes versiones de QuEChERS empleadas y QuPPE.

Fungicida	Recuperación (%)			
	QuEChERS Original	QuEChERS Europeo	QuEChERS Americano	QuPPE
<b>1,2,4-triazol</b>	49,8 (15,3)*	36,0 (10,9)	45,3 (1,4)	>200,0 (8,1)
<b>Penconazol</b>	82,2 (1,5)	119,4 (1,9)	112,9 (2,3)	85,2 (3,0)
<b>Miclobutanil</b>	78,1 (1,6)	113,5 (0,5)	103,6 (2,6)	117,3 (10,6)
<b>Ciproconazol</b>	83,5 (2,2)	113,6 (1,4)	100,9 (2,1)	100,5 (2,7)
<b>Triadimenol</b>	80,4 (1,7)	115,5 (1,1)	104,4 (2,1)	105,4 (7,4)
<b>Tebuconazol</b>	85,1 (3,2)	119,5 (0,2)	115,3 (2,2)	85,6 (3,5)
<b>Fenbuconazol</b>	75,2 (3,2)	115,7 (2,4)	108,0 (2,9)	79,6 (6,4)
<b>Propiconazol</b>	83,1 (3,7)	117,7 (0,9)	119,9 (2,9)	70,4 (8,2)
<b>Difenoconazol</b>	79,4 (7,8)	116,0 (1,7)	114,6 (4,1)	72,7 (18,7)

\* Desviación estándar relativa indicado entre paréntesis obtenido para tres réplicas.

En primer lugar se evaluó el método QuEChERS original, en su versión por tanto no tamponada. Como se puede observar en la Tabla 20, se obtuvieron valores adecuados de recuperación que oscilaban entre 75,2 – 85,1 % para todos los compuestos. Sin embargo, para 1,2,4-triazol se obtuvo una recuperación ligeramente inferior al 50 % (valor del 49,8 %). Los valores de RSD eran inferiores al 8 % excepto para 1,2,4-triazol que era del 15,3 %.

Con objeto de mejorar la recuperación de este compuesto, se probaron las otras dos versiones del QuEChERS, la europea que usa tampón citrato, y la americana que emplea tampón acetato. Con la primera, se obtuvieron buenas recuperaciones que oscilaban entre 113,5–119,5 % para los fungicidas incluidos en este estudio. Sin embargo, la recuperación para 1,2,4-triazol fue del 36,0 %. La RSD era inferior al 3 % excepto para el metabolito, que era del 10,9 %. Respecto a los resultados obtenidos con la versión americana, se obtuvieron buenas recuperaciones que oscilaban entre 100,9–119,9 % para los fungicidas, aunque la recuperación para 1,2,4-triazol fue del 45,3 %. La RSD obtenida no superaba el 5 % para todos los compuestos triazólicos incluyendo el 1,2,4-triazol. Por lo tanto, y atendiendo a los resultados obtenidos para los fungicidas triazólicos, se puede observar que para los compuestos incluidos en este estudio, salvo el 1,2,4-triazol, las tres versiones del QuEChERS evaluadas proporcionaban buenos resultados.

Sin embargo, y teniendo en cuenta que la recuperación para 1,2,4-triazol era inferior al 50 %, se decidió emplear las condiciones de extracción del método QuPPE, que es válida para la extracción de compuestos polares. En este caso, se obtuvieron buenas recuperaciones que oscilaban entre 70,4–117,3 % para los compuestos padre, mientras que para 1,2,4-triazol, la recuperación fue > 200,0 %. El valor anómalamente alto de recuperación del 1,2,4-triazol se debe probablemente a las interferencias de los compuestos coeluidos de la matriz. Los resultados de RSD no llegaban a superar el 19 % para ninguno de los analitos en estudio. El método QuPPE publicado presenta buenas recuperaciones para el metabolito ya que usa patrones marcados isotópicamente que corrigen errores en la cuantificación. En este trabajo no se ha podido usar para el metabolito marcado isotópicamente ya que no está disponible comercialmente.

Teniendo en cuenta que los mejores resultados seguían obteniéndose con las variantes del método QuEChERS y los resultados para 1,2,4-triazol seguían siendo desfavorables utilizando el método QuPPE, se decidió evaluar el método QuEChERS no tamponado para extraer los fungicidas del resto de matrices (uva, fresa, calabacín y pimiento), ya que era más simple que las versiones tanto americana como europea. A tal fin se prepararon 3 fortificados a 100 µg/kg en cada una de las matrices objeto de estudio, obteniendo recuperaciones adecuadas en todos los casos, mostrándose un resumen de los resultados en la Tabla 21. Como se observa en dicha tabla, los valores de recuperación en uva oscilaban entre 109,3–120,0 % para los fungicidas, mientras que el valor de recuperación para 1,2,4-triazol fue del 45,4 %. En el caso de fresa, los valores de recuperación para los fungicidas triazólicos también se encontraban en el margen de 70-120 %, variando entre 78,5–114,6 % mientras que para 1,2,4-triazol, el valor de recuperación fue del 40,1 %. En el calabacín, los valores de recuperación para los fungicidas variaron entre 99,4–115,5 %, obteniéndose un valor de recuperación del 43,4 % para el 1,2,4-triazol. Finalmente, en pimiento, los valores de recuperación oscilaban entre 84,2–115,8 % para los fungicidas triazólicos mientras que para 1,2,4-triazol el valor de recuperación fue del 47,1 %.

**Tabla 21.** Valores de recuperación (y de RSD entre paréntesis) obtenidos a 100 µg/kg mediante el método de extracción QuEChERS original en uva, fresa, calabacín y pimiento.

Fungicida	Uva	Fresa	Calabacín	Pimiento
	45,4	40,1		
<b>1,2,4-triazol</b>	(7,7)*	(5,8)	43,4 (1,1)	47,1 (5,5)
	120,0	104,8		
<b>Penconazol</b>	(1,9)	(4,2)	114,3 (2,6)	103,8 (7,2)
	109,3	88,8		
<b>Miclobutanil</b>	(0,7)	(1,1)	104,7 (0,2)	84,2 (11,5)
	112,4	84,3		
<b>Ciproconazol</b>	(0,3)	(1,9)	101,7 (1,9)	97,5 (5,9)
	118,0	78,5		
<b>Triadimenol</b>	(1,0)	(0,5)	99,6 (1,2)	95,5 (4,4)
	114,7	114,6		
<b>Tebuconazol</b>	(2,8)	(3,3)	115,5 (0,9)	106,4 (10,9)
	120,0	79,7		
<b>Fenbuconazol</b>	(3,4)	(1,8)	99,4 (3,1)	85,9 (10,6)
	114,0	85,4		
<b>Propiconazol</b>	(5,1)	(3,1)	115,4 (2,5)	115,8 (7,9)
	111,3	103,7		
<b>Difenoconazol</b>	(3,7)	(4,6)	113,4 (3,8)	93,5 (14,4)

\* Valores de desviación estándar relativa entre paréntesis para un número de réplicas igual a 3.

Como se puede observar, todos los valores de recuperación para las matrices utilizando este método de extracción se ajustaban al criterio de la Guía Sante (70 % < R < 120 %), excepto para el caso del metabolito, 1,2,4-triazol. Además, los valores de RSD no superaban el 20 % exigido por la Guía Sante en ningún caso. Por ello, se utilizó este método para la extracción de los compuestos triazólicos en uva, fresa, tomate, calabacín y pimiento. Si bien para el metabolito dicha extracción no fue cuantitativa, pero dado que en todas las matrices se obtenía una buena precisión, este método puede considerarse de cribado o *screening* para dicho compuesto, o bien se debería disponer del estándar marcado isotópicamente para una correcta cuantificación (método QuPpe).

## 6.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Tras haber optimizado el método instrumental y el de extracción, se procedió a la validación del método analítico mediante el cálculo de la linealidad, efecto matriz,

veracidad, precisión, LOD y LOQ en las cinco matrices objeto de estudio: fresa, uva, tomate, calabacín y pimiento.

### 6.2.1. Linealidad

Se estudió la linealidad del método preparando rectas de calibrado en disolvente (ACN) en el intervalo de 5 a  $\mu\text{g/l}$  a 250  $\mu\text{g/l}$ . Los parámetros de la recta (pendiente y ordenada en el origen) se estimaron mediante mínimos cuadrados obteniéndose coeficientes de determinación ( $R^2$ ) > 0,99 para todos los analitos en cada una de las cinco matrices. En el Anexo A1 aparecen las representaciones gráficas de la linealidad de los compuestos objeto de estudio en disolvente.

### 6.2.2. Efecto matriz

Para poder calcular el efecto matriz (EM), se prepararon seis rectas de calibrado en el rango de 5 a 250  $\mu\text{g/kg}$ . Una de ellas se preparó en disolvente, en este caso ACN por ser el mismo agente extractante empleado en el QuEChERS original, mientras que el resto se prepararon en el extracto obtenido de blancos en cada una de las matrices en el mismo rango. El efecto matriz se estimó a partir de la ecuación 2.

$$EM (\%) = \left( \frac{\text{Pendiente calibrado en matriz}}{\text{Pendiente calibrado en disolvente}} - 1 \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

El efecto matriz se considera no significativo (siguiendo lo recomendado por la Guía Sante<sup>51</sup>) si se encuentra en el intervalo  $\pm 20 \%$ . Sin embargo, si supera el  $+ 20 \%$ , se considera que hay exaltación de la señal y si es inferior al  $- 20 \%$ , se considera que hay supresión de la señal. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 22 para las distintas matrices.

**Tabla 22.** Efecto matriz en la determinación de los fungicidas.

Analito	Efecto matriz				
	Fresa	Uva	Tomate	Calabacín	Pimiento
<b>1,2,4-triazol</b>	-73,6	-39,7	-28,4	65,3	164,2
<b>Penconazol</b>	-27,2	-10,8	0,1	8,1	-79,7
<b>Miclobutanil</b>	-19,7	10,1	-0,2	130,2	-78,8
<b>Ciproconazol</b>	-20,5	32,2	2,4	20,8	-56,9
<b>Triadimenol</b>	-25,9	71,9	1,6	60,8	-41,6
<b>Tebuconazol</b>	-20,5	63,2	7,8	16,6	-76,6
<b>Fenbuconazol</b>	-28,1	6,9	-2,8	30,1	-80,6
<b>Propiconazol</b>	-17,4	27,2	9,1	-8,1	-81,7
<b>Difenoconazol</b>	-38,0	12,5	6,2	-27,6	-86,9

En la matriz de fresa se detectó supresión iónica para todos los compuestos con valores entre -20,5 % y -73,6 %, excepto para miclobutanil y propiconazol que no presentaban efecto matriz (valores comprendidos entre  $\pm 20$  %).

En la matriz de uva se observó exaltación de la señal para ciproconazol, triadimenol, tebuconazol y propiconazol con valores entre 27,2 %- 71,9 %. Para 1,2,4-triazol había supresión iónica con un valor de -39,7 %. El resto de fungicidas no presentaba efecto matriz.

En la matriz de tomate sólo había efecto matriz para 1,2,4-triazol con un valor de -28,4 % debido a la supresión iónica. En la matriz de calabacín se observó exaltación de la señal para los compuestos 1,2,4-triazol, miclobutanil, ciproconazol, triadimenol y fenbuconazol con valores entre 30,1 % y 130,2 % y supresión iónica para difenoconazol con valor de -27,7 %. Penconazol, tebuconazol y propiconazol puede considerarse que no presentan efecto matriz.

Finamente en la matriz de pimiento había supresión iónica para todos los compuestos con valores entre -41,7 % y -86,9 %, excepto para 1,2,4-triazol que presentaba exaltación de la señal con un valor de 164,2 %.

De manera general debido a la presencia de efecto matriz, y que el mismo era diferente para cada una de las matrices evaluadas, para la determinación de estos compuestos se debía de emplear un calibrado en matriz, usando en cada caso la matriz similar en la que se tengan que determinar los analitos.

### 6.2.3. Veracidad

La veracidad se estimó mediante el cálculo de las recuperaciones de los analitos a 10 y 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en 5 alícuotas de blanco de cada una de las matrices en estudio.

En la Tabla 23 aparecen los valores de recuperación obtenidos a 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , obteniéndose valores aceptables 70,1–108,2 % para fresa, 89,8–117,8 % para uva, 74,9–118,2 % para tomate, 102,4–117,2 % para calabacín y 87,4–105,3 % para pimiento en el caso de los compuestos padre. En el caso de 1,2,4-triazol se obtuvo un valor del 33,3 % para fresa, >200 % para uva y tomate, 86,3 % para calabacín y 125,0 % para pimiento.

En la Tabla 24 aparecen los valores de recuperación obtenidos a 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  con valores aceptables de 74,5–118,5 % para fresa, 87,9–118,0 % para uva, 78,6–107,4 % para tomate, 84,8–119,6 % para calabacín y 74,0–113,1 % para pimiento en el caso de los fungicidas padre. En el caso de 1,2,4-triazol se obtuvo un valor de 40,3 % para fresa, 43,5 % para uva, 59,6 % para tomate, 40,8 % para calabacín y 55,6 % para pimiento.

**Tabla 23.** Valores de porcentajes de recuperación de los compuestos en estudio a 10 µg/kg en las cinco matrices.

Analito	RECUPERACIÓN (%)				
	Fresa	Uva	Tomate	Calabacín	Pimiento
<b>1,2,4-triazol</b>	33,3	>200	>200	86,3	125,0
<b>Penconazol</b>	102,0	113,9	74,9	111,0	100,0
<b>Miclobutanil</b>	73,5	117,8	105,9	102,2	105,3
<b>Ciproconazol</b>	70,1	91,3	93,0	110,5	102,2
<b>Triadimenol</b>	97,2	89,8	118,2	110,8	99,7
<b>Tebuconazol</b>	72,3	101,1	96,0	117,2	98,7
<b>Fenbuconazol</b>	88,1	111,8	84,6	102,4	94,8
<b>Propiconazol</b>	79,3	110,6	84,5	102,6	89,2
<b>Difenoconazol</b>	108,2	115,9	82,9	109,4	87,4

**Tabla 24.** Valores de porcentajes de recuperación de los fungicidas a 50 µg/kg en las cinco matrices.

Analito	RECUPERACIÓN (%)				
	Fresa	Uva	Tomate	Calabacín	Pimiento
<b>1,2,4-triazol</b>	40,3	43,5	59,6	40,8	55,6
<b>Penconazol</b>	118,5	117,6	78,6	116,4	91,5
<b>Miclobutanil</b>	74,5	101,7	107,4	94,6	97,0
<b>Ciproconazol</b>	75,0	87,9	94,7	101,8	113,1
<b>Triadimenol</b>	92,8	88,2	104,2	99,2	103,0
<b>Tebuconazol</b>	82,5	104,0	83,1	109,3	98,1
<b>Fenbuconazol</b>	92,8	100,9	84,5	84,8	78,0
<b>Propiconazol</b>	88,5	118,0	88,3	119,6	74,0
<b>Difenoconazol</b>	109,3	115,0	81,2	96,2	90,6

Los valores anómalos observados en algunas matrices para 1,2,4-triazol, se puede deber a la presencia de interferentes que se coextraen durante la etapa de tratamiento de muestra y pueden afectar a la señal del mismo, por lo que para la determinación de este compuesto, es necesario modificar o bien el procedimiento de extracción (inclusión de una etapa adicional de limpieza), el cromatográfico para incrementar su

tiempo de elución o uso de una fase estacionaria distinta, o bien disponer de un estándar marcado isotópicamente.

#### 6.2.4. Precisión

Se estudió la precisión intra-día (repetibilidad) fortificando para ello 5 alícuotas de blancos de cada una de las matrices a 10 y 50 µg/kg de todos los fungicidas. El estudio de precisión inter-día (precisión intermedia) se realizó fortificando 5 alícuotas de blancos de cada una de las matrices a 10 µg/kg de todos los fungicidas. Las Tablas 25, 26 y 27 reúnen los resultados obtenidos. En el estudio de precisión intra-día a 10 µg/kg los resultados fueron inferiores al 11,2 %, 9,4 %, 17,8 %, 16,0 y al 13,2 % para fresa, uva, tomate, calabacín y pimiento respectivamente. A 50 µg/kg los resultados fueron inferiores al 14,3 %, 8,7 %, 14,4 %, 7,9 % y al 13,2 % para fresa, uva, tomate, calabacín y pimiento respectivamente. Los valores eran inferiores al 17,8 % para fresa y menores o iguales que el 20,0 %, para uva, tomate, calabacín y pimiento respectivamente en el caso de la precisión inter-día. Todos los resultados anteriores eran inferiores o iguales al 20 % que exige la Guía Sante, excepto para 1,2,4-triazol en calabacín a 50 µg/kg, que presenta un valor de RSD superior al 30 %.

**Tabla 25.** Valores de precisión intra-día de los compuestos en estudio a 10 µg/kg (n = 5).

<b>Analito</b>	<b>Fresa</b>	<b>Uva</b>	<b>Tomate</b>	<b>Calabacín</b>	<b>Pimiento</b>
<b>1,2,4-triazol</b>	0,8	6,7	3,3	4,6	3,4
<b>Penconazol</b>	7,6	4,4	16,9	11,0	4,2
<b>Miclobutanil</b>	8,3	4,5	13,6	12,8	10,7
<b>Ciproconazol</b>	8,5	6,8	12,5	10,4	8,9
<b>Triadimenol</b>	9,5	8,5	11,4	7,8	10,7
<b>Tebuconazol</b>	7,4	9,4	11,3	13,1	6,4
<b>Fenbuconazol</b>	7,9	6,8	12,8	9,4	13,2
<b>Propiconazol</b>	11,2	6,9	17,8	16,0	3,4
<b>Difenoconazol</b>	8,3	8,9	17,1	14,1	7,3

**Tabla 26.** Valores de precisión intra-día de los compuestos en estudio a 50 µg/kg (n =5).

<b>Analito</b>	<b>Fresa</b>	<b>Uva</b>	<b>Tomate</b>	<b>Calabacín</b>	<b>Pimiento</b>
<b>1,2,4-triazol</b>	1,4	8,7	6,2	6,7	9,9
<b>Penconazol</b>	11,1	3,2	12,2	2,4	7,1
<b>Miclobutanil</b>	4,9	3,8	4,6	4,0	8,0
<b>Ciproconazol</b>	3,5	4,7	5,1	3,3	6,5
<b>Triadimenol</b>	2,8	4,8	5,6	2,7	7,5
<b>Tebuconazol</b>	10,6	6,7	9,3	4,0	6,9
<b>Fenbuconazol</b>	4,8	4,2	7,0	4,3	9,8
<b>Propiconazol</b>	13,1	4,2	10,9	6,3	10,8
<b>Difenoconazol</b>	14,3	5,4	14,4	7,9	7,4

**Tabla 27.** Valores de precisión inter-día de los compuestos en estudio a 10 µg/kg (n = 5).

<b>Analito</b>	<b>Fresa</b>	<b>Uva</b>	<b>Tomate</b>	<b>Calabacín</b>	<b>Pimiento</b>
<b>1,2,4-triazol</b>	15,6	16,0	19,6	39,1	20,0
<b>Penconazol</b>	12,8	18,8	20,0	20,0	11,1
<b>Miclobutanil</b>	11,1	20,1	18,2	16,8	11,8
<b>Ciproconazol</b>	9,2	15,7	10,4	17,5	14,2
<b>Triadimenol</b>	2,9	18,8	13,9	20,4	12,9
<b>Tebuconazol</b>	10,3	5,9	19,0	19,7	18,3
<b>Fenbuconazol</b>	17,8	11,2	19,9	19,9	17,0
<b>Propiconazol</b>	16,2	16,7	15,2	19,8	15,4
<b>Difenoconazol</b>	13,9	20,0	19,8	20,0	13,8

### 6.2.5. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

El LOD se estimó a partir de la mínima concentración que se podía detectar utilizando tanto la transición de cuantificación como una de confirmación del espectro de masas del analito. Para ambas transiciones, la relación *S/N* debería ser superior o igual que 3. Para la estimación de este parámetro se analizaron patrones en blanco de matriz a 1, 2, 5 y 10 µg/kg. El valor quedó fijado a 1 µg/kg para todos los compuestos excepto para fenbuconazol en tomate, el cual se fijó en 5 µg/kg y para 1,2,4-triazol, el cual se fijó a 5 µg/kg para fresa y a 2 µg/kg para calabacín y pimiento.



El LOQ se estimó a partir de la mínima concentración que se podía detectar y cuantificar con la adecuada exactitud ( $70 \% < R < 120 \%$ ) y precisión ( $RSD < 20 \%$ ). Dicho valor se fijó a  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ , excepto para 1,2,4-triazol, que atendiendo a los resultados obtenidos previamente, no se podía llevar a cabo una cuantificación fiable con las condiciones optimizadas, aunque al menos sí se podía detectar.

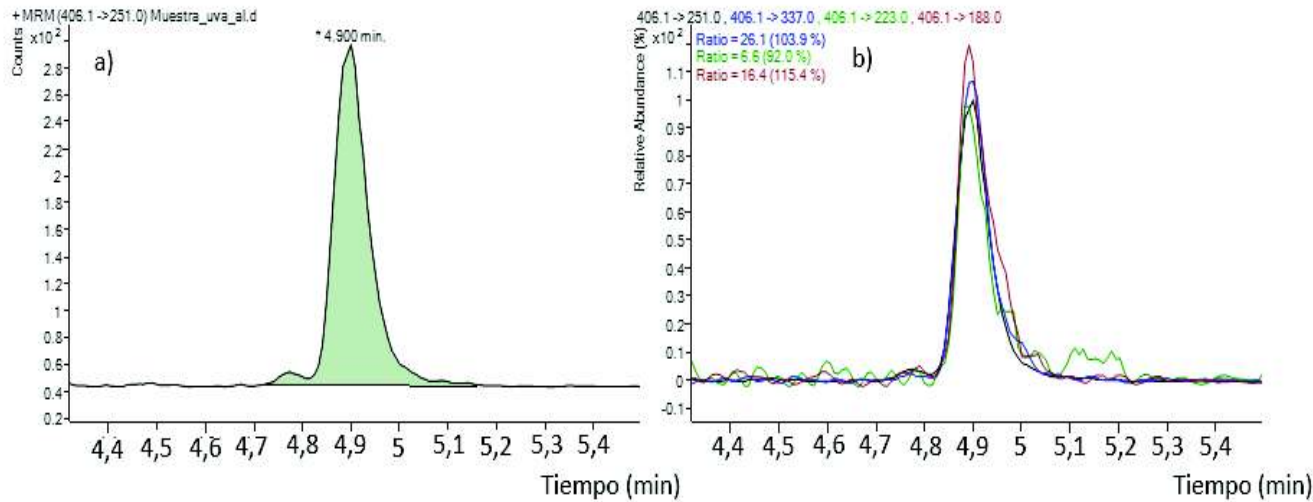
Todos estos valores son inferiores a los correspondientes MRLs que establece la EU para los compuestos padre objeto de estudio, por lo que este método analítico es válido para detectar y cuantificar los fungicidas triazólicos en las cinco matrices objeto de estudio. Como ya se indicó previamente para 1,2,4-triazol la EU aún no ha establecido un MRL, y por tanto se debería poder estimar a  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ , aunque como se ha comentado dicho compuesto en este trabajo sólo se incluye con fines de detección.

### 6.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES

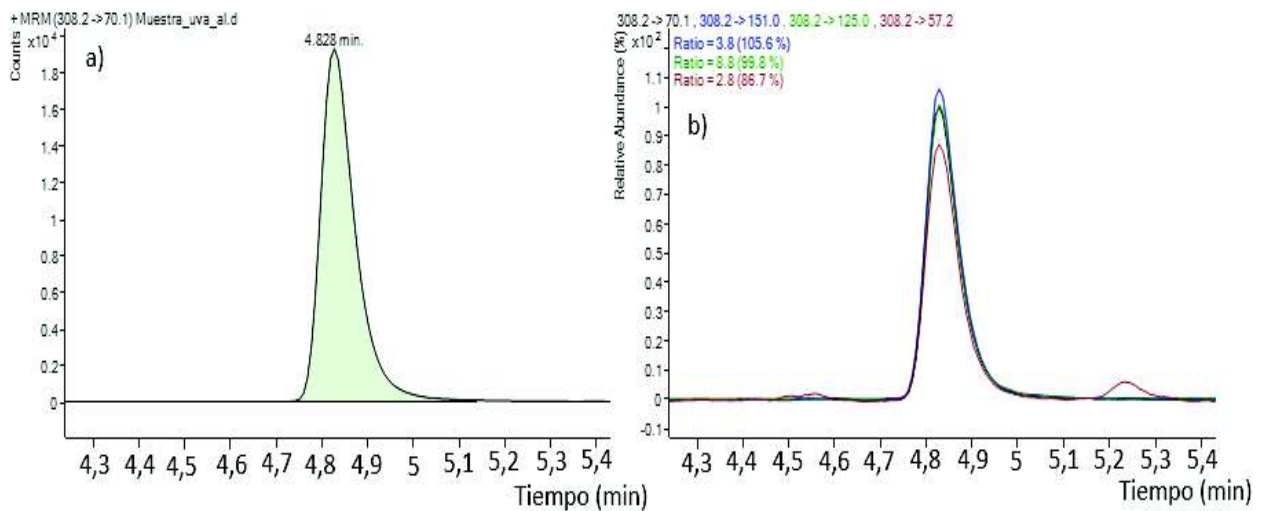
Después de optimizar y validar el método analítico, se procedió a analizar 33 muestras reales de distintos tipos de tomate (tomate cherry, tomate pera, tomate ensalada, tomate canario, tomate negro y 2 de tomate ecológico), calabacín (3 calabacín verde, 2 calabacín blanco y uno verde ecológico), pimiento (3 de pimiento rojo, 3 de pimiento verde, 2 de pimiento italiano y uno de pimiento ecológico), uva (3 de uva negra y 3 de uva blanca) y fresa (5 de fresa y uno de fresón), que se obtuvieron de diferentes supermercados de Almería.

Con objeto de asegurar la calidad de los resultados obtenidos, en cada conjunto de muestras analizadas se incluyó un control de calidad interno, que constaba del análisis de: (i) un blanco de cada matriz sin analito para descartar interferencias de la matriz durante el procedimiento; (ii) la realización de un calibrado en matriz para cada una de las matrices a analizar y (iii) la realización de un fortificado a  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  en cada una de las matrices a analizar para comprobar la eficacia del método de extracción.

El análisis de las muestras reales mostró que todos los resultados obtenidos fueron inferiores al LOQ establecido para cada uno de los compuestos, aunque sí se detectaron trazas de difenoconazol, tebuconazol y miclobutanil en una muestra de uva blanca. En la Figura 9 se muestra el cromatograma obtenido para difenoconazol y en la Figura 10 el obtenido para tebuconazol.



**Figura 9.** Cromatograma iónico extraído de difenoconazol en una muestra de uva detectado por debajo del LOQ (transición monitorizada: 406 > 251) (a), cromatograma iónico extraído monitorizando los iones de confirmación (406 > 337; 406 > 223; 406 > 188) (b).



**Figura 10.** Cromatograma iónico extraído de tebuconazol en una muestra de uva detectado por debajo del LOQ (transición monitorizada: 308 > 70) (a), cromatograma iónico extraído monitorizando los iones de confirmación (308 > 151; 308 > 125; 308 > 57) (b).

## 7. CONCLUSIONES

Tras haber realizado el trabajo se han obtenido las siguientes conclusiones:

- Se ha desarrollado un método instrumental para la determinación de los fungicidas triazólicos: ciproconazol, difenoconazol, fenbuconazol, miclobutanil, penconazol, propiconazol, tebuconazol y triadimenol, así como del metabolito común 1,2,4-triazol, mediante LC-MS/MS.
- Tras evaluar diferentes métodos de extracción, se ha aplicado un método de extracción QuEChERS que ha resultado ser efectivo, barato y sencillo para la extracción cuantitativa de los ocho fungicidas triazólicos.
- Las malas recuperaciones obtenidas para 1,2,4-triazol indican que este compuesto requiere de más investigación y no puede ser determinado por métodos multi-residuo convencionales.
- Se ha validado el método con los parámetros de linealidad, efecto matriz, veracidad, precisión, LOD y LOQ obteniéndose valores aceptables de veracidad y precisión y un valor de LOQ por debajo de los MRLs estipulados por la EU, para los fungicidas triazólicos, excepto el metabolito, en las matrices de fresa, uva, tomate, calabacín, y pimiento.
- El sistema LC-MS/MS ha demostrado ser una herramienta muy útil para la determinación de los fungicidas triazólicos gracias a su adecuada sensibilidad. Por ello, puede ser utilizado para la determinación de estos compuestos en análisis rutinarios.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

---

<sup>1</sup> Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas (FAO) [Online] <http://www.fao.org/3/a-a0220s.pdf> (acceso junio de 2019)

<sup>2</sup> Residuos de plaguicidas en los alimentos. Organización Mundial de la Salud (OMS). [Online] <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food> (acceso junio de 2019)

<sup>3</sup> División de Población de Naciones Unidas [Online] <https://www.un.org/es/sections/issues-depth/population/index.html> (acceso junio de 2019)

<sup>4</sup> Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) [Online] <http://www.fao.org/home/es/> (acceso junio de 2019)

<sup>5</sup> Organización Mundial de la Salud (OMS) [Online] <https://www.who.int/es> (acceso junio de 2019)

<sup>6</sup> REGLAMENTO (CE) NO 396/2005 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo [Online] <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=celex:32005R0396> (acceso junio de 2019)

<sup>7</sup> Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Pesticidas: clasificación y riesgos principales [Online] [https://www.insst.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/101a200/ntp\\_143.pdf](https://www.insst.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/101a200/ntp_143.pdf) (acceso junio de 2019)

- <sup>8</sup> Cantidades comercializadas por los titulares autorizados de los principales grupos de sustancias activas en España [Online] <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/estadisticas-medios-produccion/fitosanitarios.aspx> (acceso junio de 2019)
- <sup>9</sup> T. Roberts, D. Hutson. *Metabolic Pathways of Agrochemicals Part 2: Insecticides and Fungicides*, Royal Society of Chemistry, **1999**, 1011 – 1101.
- <sup>10</sup> F. C. Odds, A. J. P. Brown, N. A. R. Gow. *Trends in Microbiol*, 11, **2003**, 272-279.
- <sup>11</sup> B. Brave. *Fluconazole: Perfect Medication for Any Fungal Infection Like , Yeast Infection, Toilet Infection, Toenail, Jock Itch*, CreateSpace Independent Publishing Platform, **2018**.
- <sup>12</sup> Registro de Productos Fitosanitarios [Online] <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/productos/consusact.asp> (acceso noviembre 2018)
- <sup>13</sup> D. I. S. Kolberg, S. Zechmann, C. Wildgrube, I. Sigalov. E. Scherbaum, M. Anastassiades. *Determination of triazole derivative metabolites (TDMs) in fruit and vegetables using the QuPpe method and differential mobility spectrometry (DMS) and survey of the residue situation in organic and conventional produce*, EU Reference Laboratory for pesticides requiring Single Residue Methods (EURL-SRM), **2016**, 2 – 36.
- <sup>14</sup> D. W. Nelson, D. Huber. *Nitrification inhibitors for corn production*, National Corn Handbook, Iowa State University, **1992**.
- <sup>15</sup> H. Liu, G. Yao, X. Liu, C. Liu, J. Zhan, D. Liu, P. Wang, Z. Zhou, *J. Agric. Food Chem*, 65, **2017**, 2481-2487.
- <sup>16</sup> T. Liu, J. Diao, S. Di, Z. Zhou. *Environ. Sci. Technol*, 48, **2014**, 6687-6693.
- <sup>17</sup> REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) N<sup>o</sup> 540/2011 DE LA COMISIÓN de 25 de mayo de 2011 por el que se aplica el Reglamento (CE) n<sup>o</sup> 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a la lista de sustancias activas autorizadas
- <sup>18</sup> Base de datos de plaguicidas de la EU [Online] <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN> (acceso noviembre 2018).
- <sup>19</sup> EFSA (European Food Safety Authority). *EFSA Journal*, 16, **2018**, 5376. Disponible en: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5376>
- <sup>20</sup> S. Wu, H. Zhang, K. Zheng, B. Meng, F. Wang, Y. Cui, S. Zeng, K. Zhang, D. Hu. *Simultaneous determination and method validation of difenoconazole, propiconazole and pyraclostrobin in pepper and soil by LC-MS/MS in field trial samples from three provinces, China*, *Biomedical Chromatogr*, 32, **2018**, 1-9.
- <sup>21</sup> J. C. Rockett, M. G. Narotsky, K. E. Thompson, I. Thillainadarajah, C. R. Blystone, A. K. Goetz, H. Ren, D. S. Best, R. N. Murrell, H. P. Nichols, J. E. Schmid, D. C. Wolf, D. J. Dix. *Effect of conazole fungicides on reproductive development in the female rat*. *Reprod. Toxicol*. 22, **2006**, 647–658.
- <sup>22</sup> Y. Li, F. Dong, X. Liu, J. Xu, J. Li, Z. Kong, X. Chen, Y. Zheng. *Enantioselective determination of triazole fungicide tebuconazole in vegetables, fruits soil and water by chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, *J. Sep. Sci*. 35, **2012**, 206–215.
- <sup>23</sup> E. Sancho, M. J. Villarroel, C. Fernández, E. Andreu, M. D. Ferrando. *Short-term exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (Danio rerio)* *Ecotox. Environ. Safe*. 73, **2010**, 370–376.
- <sup>24</sup> X. G. Liu, F. S. Dong, X. Wang, Y. Q. Zheng. *The dissipation rates of myclobutanil and residue analysis in wheat and soil using gas chromatography-ion trap mass spectrometry*. *Int. J. Environ. Anal. Chem*. 89, **2009**, 957–967.
- <sup>25</sup> P. G. Schermerhorn, P. E. Golden, A. J. Krynitsky, W. M. Leimkuehler. *Determination of 22 triazole compounds including parent fungicides and metabolites in apples, peaches, flour, and water by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. *J. AOAC Int*. 88, **2005**, 1491–1502.
- <sup>26</sup> Y. S. Wu, H. K. Lee, S. F. Y. Li. *High-performance chiral separation of fourteen triazole fungicides by sulfated beta-cyclodextrin-mediated capillary electrophoresis*. *J. Chromatogr., A* **2001**, 912, 171– 179.

- <sup>27</sup> W. A. W. Ibrahim, D. Hermawan, M. M. Sanagi, H. Y. Aboul-Enein. *Cyclodextrin-modified MEKC for enantioseparation of hexaconazole, penconazole, and myclobutanil*. *J. Sep. Sci.* 32, **2009**, 466–471.
- <sup>28</sup> W. A. W. Ibrahim, D. Hermawan, M. M. Sanagi, H. Y. Aboul-Enein. *Stacking and sweeping in cyclodextrin-modified MEKC for chiral separation of hexaconazole, penconazole and myclobutanil*. *Chromatographia* 71, **2010**, 305–309.
- <sup>29</sup> Y. Zhou, L. Li, K. Lin, X. P. Zhu, W. P. Liu. *Enantiomer separation of triazole fungicides by high-performance liquid chromatography*. *Chirality* 21, **2009**, 421–427.
- <sup>30</sup> J. Qiu, S. H. Dai, C. M. Zheng, S. M. Yang, T. T. Cai, M. Bie. *Enantiomeric separation of triazole fungicides with 3- $\mu$ m and 5- $\mu$ m particle chiral columns by reverse-phase high-performance liquid chromatography*. *Chirality* 23, **2011**, 479–486.
- <sup>31</sup> P. Wang, D. H. Liu, X. Gu, S. R. Jianq, Z. Q. Zhou. *Quantitative analysis of three chiral pesticide enantiomers by high performance column liquid chromatography*. *J. AOAC Int.* 91, **2008**, 1007–1012.
- <sup>32</sup> Q. Tian, Z. Q. Zhou, C. G. Lv, Y. Huang, L. P. Ren. *Simultaneous determination of paclobutrazol and myclobutanil enantiomers in water and soil using enantioselective reversed-phase liquid chromatography*. *Anal. Methods* 2, **2010**, 617–622.
- <sup>33</sup> F. S. Dong, X. G. Liu, L. Cheng, W. Y. Chen, J. Li, D. M. Qin, Y. Q. Zheng. *Determination of metaflumizone residues in cabbage and soil using ultra-performance liquid chromatography/ESI MS/MS*. *J. Sep. Sci.* 32, **2009**, 3692–3697.
- <sup>34</sup> A. B. Bordin, L. Minetto, I. N. Filho, L. L. Beal, S. Moura. *Determination of pesticide residues in whole wheat flour using modified QuEChERS and LC–MS/MS*. *Food Anal. Met.* 10, **2017**, 1–9.
- <sup>35</sup> F. R. B. Konatu, I. C. S. F. Jardim. *J. Sep. Sci.* 41, **2018**, 1726–1733.
- <sup>36</sup> M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Štajnbaher, F. J. Shenck. *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce*. *J. AOAC Int.* 86, **2003**, 412–431.
- <sup>37</sup> S.J. Lehotay, M. O'Neil, J. Tully, A.V. García, M. Contreras, H. Mol, V. Heinke, A. Parker. *Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: Collaborative study*. *J. AOAC Int.* 90, **2007**, 485–520.
- <sup>38</sup> S.J. Lehotay, K.A. Son, H. Kwon, U. Koesukwiwat, W. Fu, K. Mastovska, E. Hoh, N. Leepipatpiboon. *Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables*. *J. Chromatogr. A.* 1217, **2010**, 2548–2560.
- <sup>39</sup> Q. Zhang, B. Gao, M. Tian, H. Shi, X. Hua, M. Wang. *Enantioseparation and determination of triticonazole enantiomers in fruits, vegetables, and soil using efficient extraction and clean-up methods*. *Journal of Chromatography B*, 1009–1010, **2016**, 130–137.
- <sup>40</sup> H. Zhang, X. Wang, M. Qian, X. Wang, H. Xu, M. Xu, Q. Wang. *Residue analysis and degradation studies of fenbuconazole and myclobutanil in strawberry by chiral high-performance liquid chromatography\_tandem mass spectrometry*. *J. Agric. Food Chem.* 59, **2011**, 12012–12017.
- <sup>41</sup> F. Dong, L. Cheng, X. Liu, J. Xu, J. Li, Y. Li, Z. Kong, Q. Jian, Y. Zheng. *Enantioselective analysis of triazole fungicide myclobutanil in cucumber and soil under different application modes by chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. *J. Agric. Food Chem.* 60, **2012**, 1929–1936.
- <sup>42</sup> Y. Li, F. Dong, X. Liu, J. Xu, J. Li, Z. Kong, X. Chen, Y. Zheng. *Enantioselective determination of triazole fungicide tebuconazole in vegetables, fruits soil and water by chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. *J. Sep. Sci.* 35, **2012**, 206–215.
- <sup>43</sup> X. Chen, X. Fan, Y. Ma, J. Hu. *Dissipation behaviour, residue distribution and dietary risk assessment of tetraconazole and kresoxim-methyl in greenhouse strawberry via RRLCQqQ- MS/MS technique*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 148, **2018**, 799–804.

- <sup>44</sup> Z. Zhang, Q. Zhang, B. Gao, G. Gou, L. Li, H. Shi, M. Wang. *Simultaneous enantioselective determination of the chiral fungicide prothioconazole and its major chiral metabolite prothioconazole-desthio in food and environmental samples by ultraperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*, *J. Agric. Food Chem.* **65**, **2017**, 8241–8247.
- <sup>45</sup> F. Zhao, Y. She, C. Zhang, X. Cao, S. Wang, L. Zheng, M. Jin, H. Shao, F. Jin, J. Wang. *Selective solid-phase extraction based on molecularly imprinted technology for the simultaneous determination of 20 triazole pesticides in cucumber samples using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, *J. Chromatogr. B* **1064**, **2017**, 143–150.
- <sup>46</sup> M. Anastassiades, D. I. Kolberg, D. Mack, C. Wildgrube, I. Sigalova, D. Roux, D. Fügél (2019). QuPPE-Method, version 10.1 [Online] [http://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth\\_QuPPE\\_PO\\_V10\\_1\(1\).pdf](http://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPPE_PO_V10_1(1).pdf) (acceso junio 2019).
- <sup>47</sup> A. Blondel, B. Krings, N. Ducat, O. Pigeon. *Validation of an analytical method for 1,2,4-triazole in soil using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry and monitoring of propiconazole degradation in a batch study*, *J. Chromatogr. A*, **1562**, **2018**, 123-127.
- <sup>48</sup> F. R. B. Konatu, I. C. S. F. Jardim. *J. Sep. Sci.* **41**, **2018**, 1726-1733.
- <sup>49</sup> M. Youness, M. Sancelme, B. Combourieu, P. Besse-Hoggan. *Identification of new metabolic pathways in the enantioselective fungicide tebuconazole biodegradation by Bacillus sp. 3B6*, *J. Hazard. Mat.*, **351**, **2018**, 160-168
- <sup>50</sup> T. Nardin, C. Barnaba, F. Abballe, G. Trenti, M. Malacarne, R. Larcher. *Fast analysis of quaternary ammonium pesticides in food and beverages using cation-exchange chromatography coupled with isotope-dilution high-resolution mass spectrometry*, *J. Sep. Sci.*, **40**, **2017**, 3928-3937.
- <sup>51</sup> Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. SANTE/11813/2017 [Online] [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides\\_mrl\\_guidelines\\_wrkdoc\\_2017-11813.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf) (acceso mayo de 2019).
- <sup>52</sup> C. Dass. *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*, 1ª ed., Ed. Wiley, Estados Unidos, **2017**.
- <sup>53</sup> A. B. Pomilio, E. A. Bernatené, A. A. Vitale, *Espectrometría de masas en condiciones ambientales con ionización por desorción con electrospray*, *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* **2011**, **45**, 47-79.
- <sup>54</sup> High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry (HPLC/MS). University of Bristol. [Online] <http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/hplcms.html> (acceso mayo de 2019).
- <sup>55</sup> La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos (EURACHEM, 2016) [Online] [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd\\_ed\\_ES.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf) (acceso mayo de 2019).
- <sup>56</sup> D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Amsterdam, **1997**.
- <sup>57</sup> Chemspider [Online] <http://www.chemspider.com/> (acceso junio de 2019).
- <sup>58</sup> W. M. A. Niessen, R. A. Correa C. *Interpretation of MS-MS Mass Spectra of Drugs and Pesticides*, Wiley, **2017**, 290.



## 9. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AOAC: Asociación Oficial de Químicos Analíticos (*Association of Official Analytical Chemists*)

CE: Electroforesis Capilar (*Capillary Electrophoresis*)

CL50: Concentración Letal al 50 % (*lethal concentration at 50 %*)

DL50: Dosis Letal al 50 % (*Lethal Dose at 50 %*)

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*)

EPA: Agencia de Protección Ambiental (*Environmental Protection Agency*)

ESI: Ionización por Electro spray (*Electrospray Ionization*)

EU: Unión Europea (*European Union*)

EURL-SRM: Laboratorio de Referencia de la UE para plaguicidas que requieren métodos simples de residuos (*EU Reference Laboratory for Single Residue Methods*)

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (*Food and Agriculture Organization*)

GC: Cromatografía de Gases (*Gas Chromatography*)

GCB: Carbón Negro Grafitizado (*Graphitized Carbon Black*)

HPLC: Cromatografía de Líquidos de Alto Rendimiento (*High Pressure Liquid Chromatography*)

HRMS: Espectrometría de Masas de Alta Resolución (*High Resolution Mass Spectrometry*)

JECFA: Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*)

JMPR: Reunión de la Junta FAO/WHO sobre Residuos de Plaguicidas (*Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues*)

LC: Cromatografía de Líquidos (*Liquid Chromatography*)

LOD: Límite de Detección (*Limit Of Detection*)

LOQ: Límite de Cuantificación (*Limit Of Quantification*)

MEKC: Cromatografía Micelar Electrocinética (*Micellar electrokinetic Chromatography*)

MIP: Polímero Molecularmente Impreso (*Molecularly Printed Polymer*)

MRL: Límite Máximo de Residuos (*Maximum Residue Limit*)

MS: Espectrometría de Masas (*Mass Spectrometry*)

PGC: Carbón Grafitizado Poroso (*Porous Graphitic Carbon*)

PSA: Amina Primaria Secundaria (*Primary Secondary Amina*)

QuEChERS: Rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro (*Quick, Easy, Cheaper, Effective, Rugged, Safe*)



QuPPE: Extracción Rápida de Plaguicidas Polares (*Quick Polar Pesticides Extraction*)

RSD: Desviación Estándar Relativa (*Relative Standard Deviation*)

SPE: Extracción en Fase Sólida (*Solid Phase Extraction*)

TA: Triazol Alanina (*Triazole Alanine*)

TAA: Triazol Ácido Acético (*Triazole Acetic Acid*)

TDM: Metabolito Derivado del Triazol (*Triazole Derivative Metabolite*)

TIC: Cromatograma de Iones Totales (*Total Ion Chromatogram*)

TLA: Triazol Ácido Láctico (*Triazole Lactic Acid*)

TOF: Tiempo de Vuelo (*Time Of Flight*)

TRR: Residuos Radiactivos Totales (*Total Radioactive Residues*)

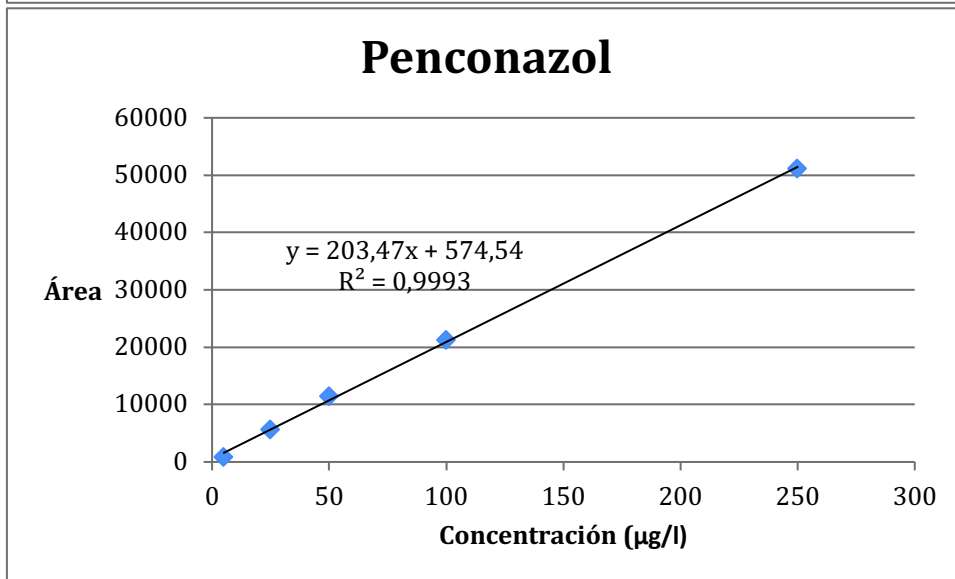
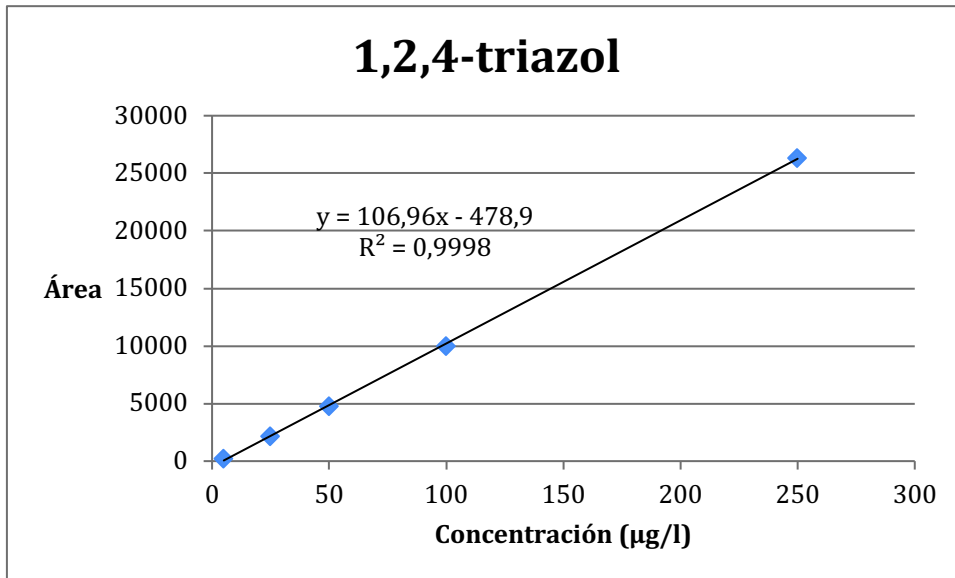
TRZ: 1,2,4-triazol (*1,2,4-triazole*)

WHO: Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*)

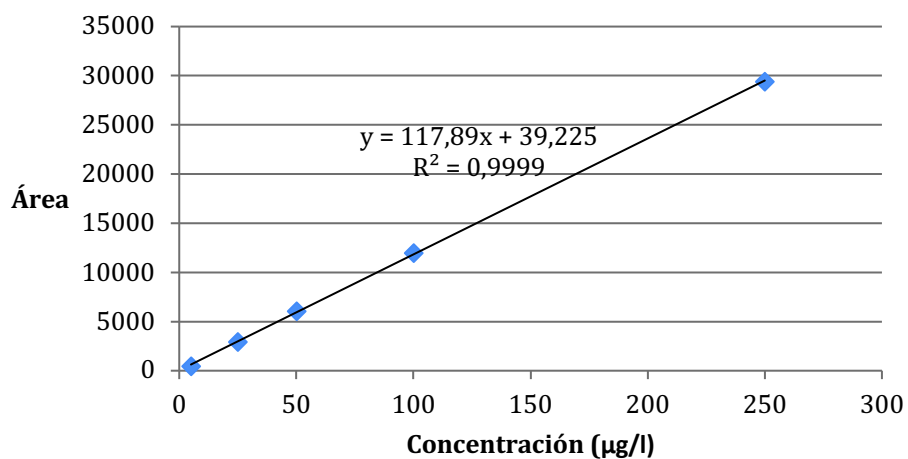
# **ANEXOS**



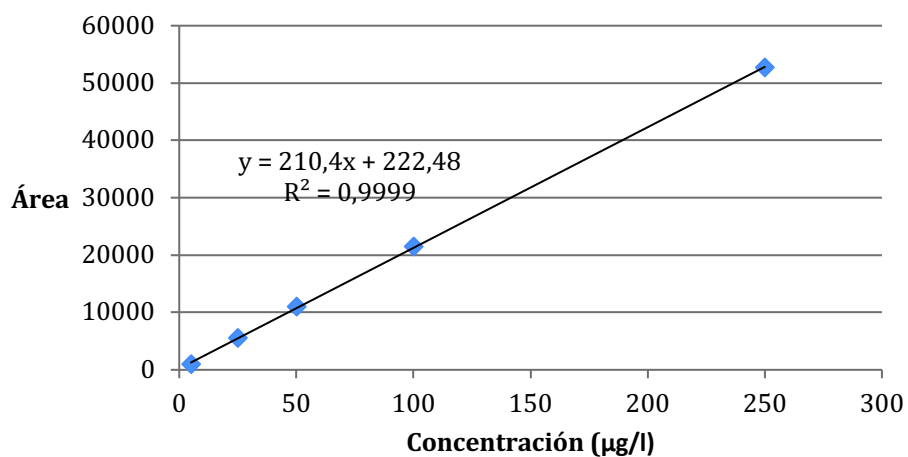
**ANEXO 1: REPRESENTACIONES GRÁFICAS DE LA LINEALIDAD DE CADA UNO DE LOS FUNGICIDAS**



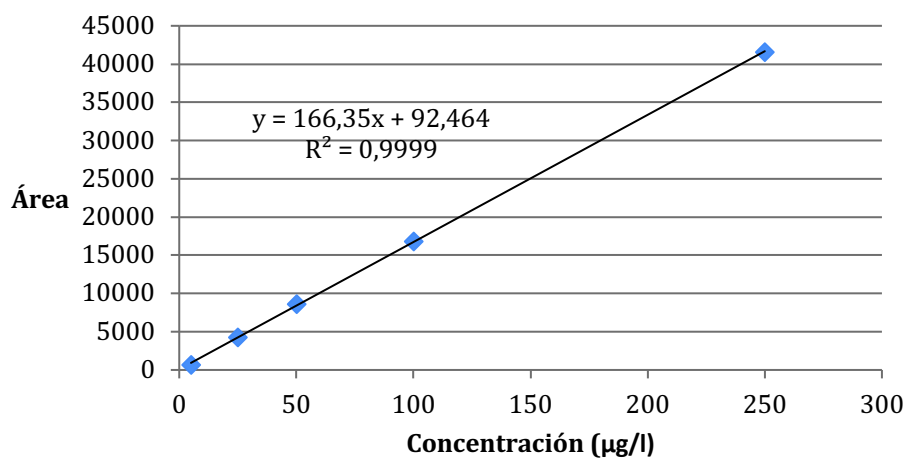
### Miclobutanil



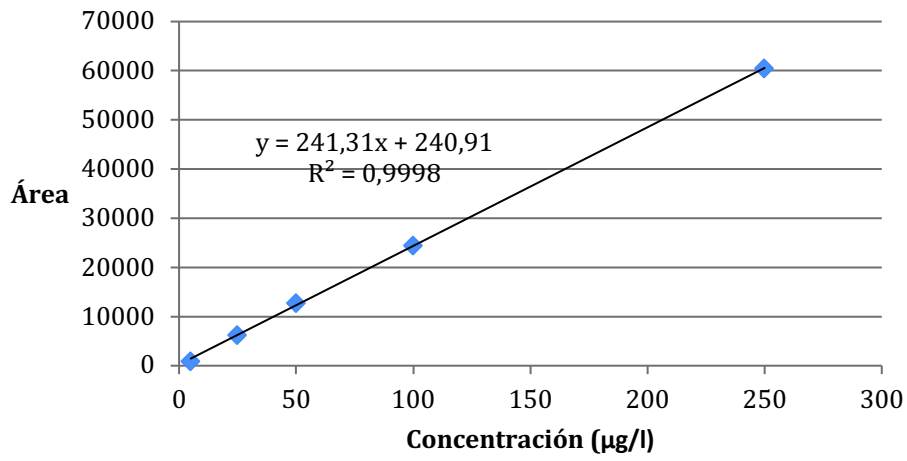
### Ciproconazol



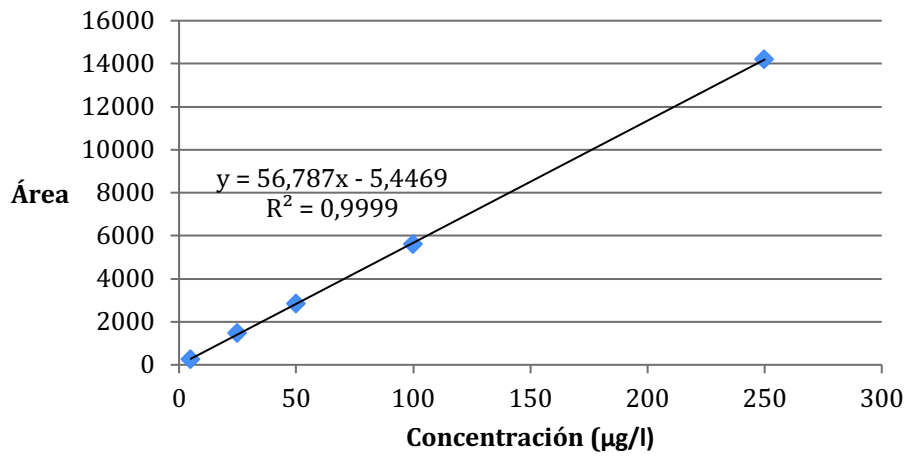
### Triadimenol

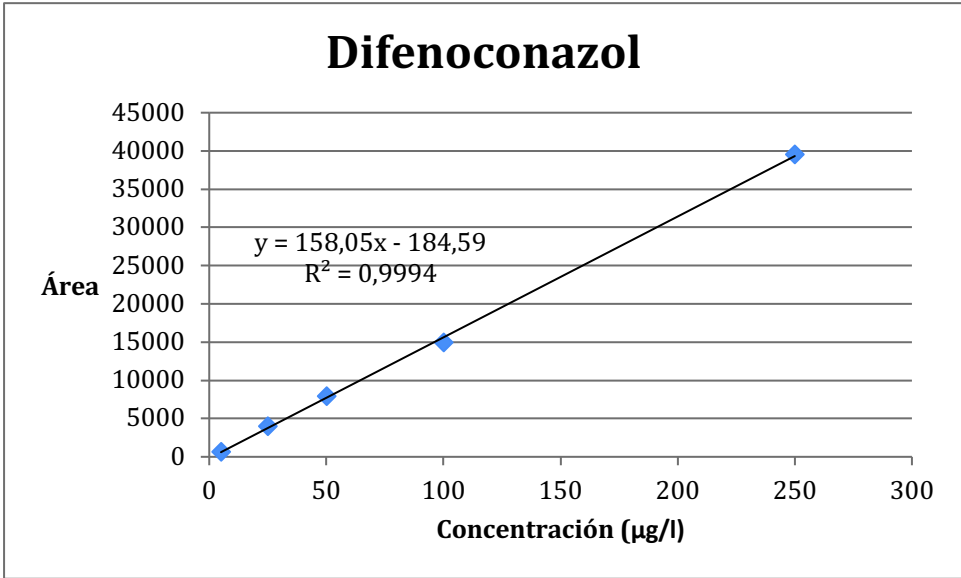
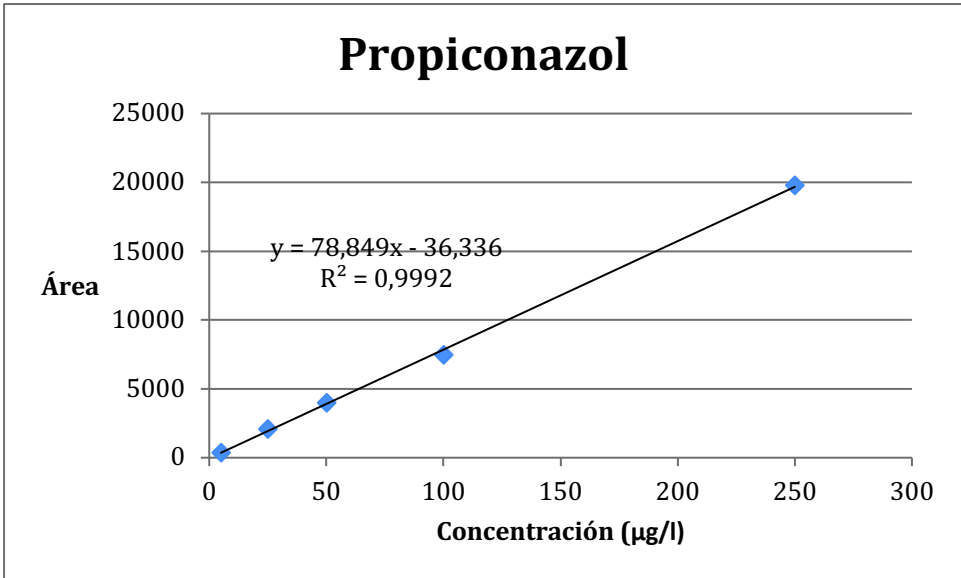


## Tebuconazol



## Fenbuconazol





**Figura A1.1.** Representaciones gráficas de la linealidad de cada fungicida en disolvente (ACN).