



# Universitat Jaume I

## Labser Laboratorio Agroalimentario

MÁSTER INTERUNIVERSITARIO EN TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS  
APLICADAS

*Análisis de rutina y diseño de dos métodos para plaguicidas muy polares  
y ácidos en cítricos*

Javier López Vázquez

Trabajo Fin de Máster en Química

Castellón, Junio 2018

**La Dra. María Ibáñez Martínez, Profesora Ayudante Doctora del Departamento de Química Física y Analítica de la Universitat Jaume I, y Sonia Fuster Moliner, Responsable Técnico de Labser, tutora y supervisora del Trabajo de Fin de Máster de D. Javier López Vázquez, respectivamente, dan su aprobación y visto bueno a la presentación de este trabajo.**

**Para que así conste firman el documento en Castellón de la Plana, el 28 de Junio de 2018.**

**Fdo.: María Ibáñez Martínez**

**Fdo.: Sonia Fuster Moliner**

# ÍNDICE

## Índice

<b>1. Abstract</b> .....	1
<b>2. Objetivos</b> .....	2
<b>3. Introducción</b> .....	3
3.1- Labser .....	3
3.2- Plaguicidas en frutas .....	3
3.3- Cromatografía líquida de alta eficacia .....	5
3.4- Cromatografías de gases .....	7
3.5- Espectrometría de masas .....	9
3.5.1- <i>Analizadores de Espectrometría de Masas</i> .....	12
3.5.2- <i>Detectores de masa</i> .....	13
3.5.3- <i>Espectrometría de masas en tandem</i> .....	13
<b>4. Análisis de rutina</b> .....	16
4.1- Material.....	16
4.2- Reactivos y patrones .....	16
4.3- Instrumentación.....	17
4.4- Muestras.....	18
4.5- Preparación de soluciones patrón y multipatrón.....	18
4.6- Recta de calibrado .....	19
4.7- Estudio de caducidades y verificación de soluciones patrón y multipatrón .....	20
4.8- Preparación de muestras.....	22
4.8.1- <i>Análisis químico de frutas</i> .....	22
4.8.2- <i>Análisis fisicoquímico de aguas</i> .....	25
4.9- Preparación del extracto blanco y preconcentrado de naranja .....	25
<b>5. Investigación</b> .....	26
5.1- Material.....	26
5.2- Reactivos y disolventes .....	26
5.3- Instrumentación.....	27
5.4- Preparación de soluciones patrón .....	28
5.5- Desarrollo del método cromatográfico.....	28
5.5.1- <i>Método para plaguicidas muy polares</i> .....	28
5.5.2- <i>Método para plaguicidas ácidos</i> .....	32
<b>6. Conclusiones</b> .....	38
<b>7. Bibliografía</b> .....	39
<b>8. Anexo</b> .....	41

# **ABSTRACT**

## **1. Abstract**

La contaminación del medioambiente por plaguicidas afecta a la sociedad, produciendo riesgos para la salud. Estos se liberan de manera controlada o descontrolada en los medios de cultivo para el control de plagas, siendo capaces de traspasar barreras naturales y antropogénicas. Por lo tanto, los podemos encontrar en el aire que respiramos, agua de bebida y frutos de los cultivos. En la actualidad, su detección es complicada debido a la gran variedad de plaguicidas que podemos encontrar.

El objetivo de este Trabajo Fin de Máster es diseñar y optimizar dos métodos para determinar plaguicidas muy polares y ácidos en muestras de cítricos, mediante el empleo de la cromatografía líquida en fase reversa y uso de pares iónicos acoplada a la espectrometría de masas en tándem.

Del mismo modo, se ha realizado también una inmersión en el laboratorio de rutina preparando los extractos de las muestras de diferentes variedades de frutas para inyectar en el cromatógrafo de líquidos y gases ambos acoplados a la espectrometría de masas en tándem.

## **OBJETIVOS**

## 2. Objetivos

El objetivo principal de este Trabajo Fin de Máster es realizar una inmersión en el laboratorio de rutina, preparando muestras para cromatografía de gases y líquidos ambos acoplados a la espectrometría de masas en tándem. Además de diseñar y optimizar dos métodos analíticos para la determinación de plaguicidas muy polares y plaguicidas ácidos, ambos en cítricos. Para el diseño de los métodos, se emplea la cromatografía líquida en fase reversa y uso de pares iónicos acoplada a la espectrometría de masas en tándem.

Para lograr este último objetivo se siguieron las siguientes pautas:

- Empleo de patrones para desarrollar los diferentes métodos individuales para la determinación de plaguicidas muy polares y ácidos.
- Optimización de los métodos.
- Aplicación en muestras reales de cítricos.

# **INTRODUCCIÓN**

## 3. Introducción

### 3.1- Labser

Labser es un laboratorio de servicios agroalimentario, que se encuentra en una de las zonas cítricas más importantes de la Comunidad Valenciana, Betxí (Castellón) (**Figura 1**). Está especializado principalmente en el análisis de frutas y verduras para el control multiresiduo de plaguicidas, estando este método acreditado por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC). Además, realizan otros tipos de análisis denominados fisicoquímicos para suelos y aguas, colaborando con otras instituciones para terminar parte de estos análisis<sup>[1]</sup>.



**Figura 1.** Imagen de la empresa desde fuera.

La empresa no solo realiza análisis, sino que también asesora a los agricultores y a las empresas agroalimentarias en la implantación y seguimiento de estándares de calidad. Además, otro factor importante es su versatilidad y esto hace que, en función de los tipos de análisis que solicite cada cliente, se puedan desarrollar controles específicos a su petición.

### 3.2- Plaguicidas en frutas

Los plaguicidas son agentes químicos, o biológicos, que se usan para proteger a los cultivos de enfermedades, malas hierbas e insectos<sup>[2]</sup>. Debido a la globalización, la población exige una mayor demanda y consumo de gran variedad de vegetales y frutas que se encuentran cultivados en medios de cultivo a cielo abierto o en invernaderos, en los que se emplean diferentes tipos de plaguicidas. Este hecho en agricultura genera beneficios porque disminuye la pérdida de cultivos y aumenta la producción<sup>[3]</sup>.

Los plaguicidas empleados de manera descontrolada, dependiendo de la toxicidad y el tiempo de exposición, representan un riesgo potencial a los consumidores y al medio ambiente (suelos y agua) (**Figura 2**). Estos disruptores afectan a la salud, pudiendo contribuir a causar infertilidades, malformaciones congénitas, diabetes e incluso Párkinson, Alzheimer o cáncer<sup>[2]</sup>.

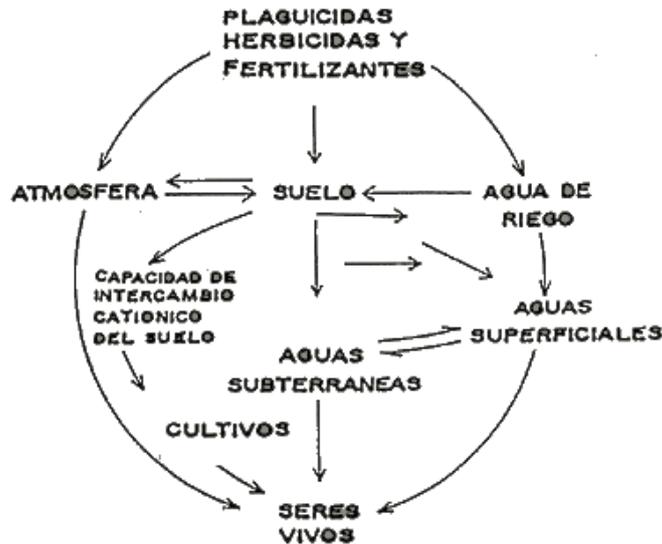


Figura 2. Ciclo de los plaguicidas<sup>[4]</sup>.

En Europa, casi la mitad de los alimentos contiene restos de plaguicidas y, de este porcentaje, el 2,6 % supera los niveles legales establecidos, según la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). En el caso de España, el 3 % de las frutas y verduras vendidas supera el límite legal de plaguicidas. De hecho, a principios del año 2015, otros países de la Unión Europea detectaron partidas de fresas y endivias procedentes de España que estaban contaminadas con plaguicidas prohibidos<sup>[1,5]</sup>.

Esto ha hecho que la Comunidad Europea (CE), la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y algunos gobiernos hayan tomado medidas para conseguir el monitoreo y control de los plaguicidas en actividades prioritarias para determinar la calidad y seguridad de los alimentos, estableciendo los Límites Máximos Residuales (LMRs)<sup>[2,5]</sup>. El LMR es la cantidad máxima de residuos de un determinado plaguicida sobre un determinado producto agrícola permitido por la ley. Por lo tanto, es la cantidad que no se puede sobrepasar para que el producto pueda ser puesto en circulación o comercializado<sup>[6]</sup>.

En países industrializados como España existen leyes para regular el uso de estos productos fitosanitarios y su uso sostenible como se muestra en el RD1311/2012<sup>[7]</sup>, además de la monitorización continuada de los residuos de plaguicidas. Por lo tanto, es necesario desarrollar y validar métodos analíticos para controlar la presencia de plaguicidas, que puedan ser empleados para el análisis de rutina. Como en este Trabajo Fin de Máster, en el cual se trata de diseñar dos métodos analíticos para determinar plaguicidas ácidos y otro para plaguicidas muy polares en cítricos (Figura 3). Con el objetivo de poder monitorizarlos en muestras reales una vez implantados.

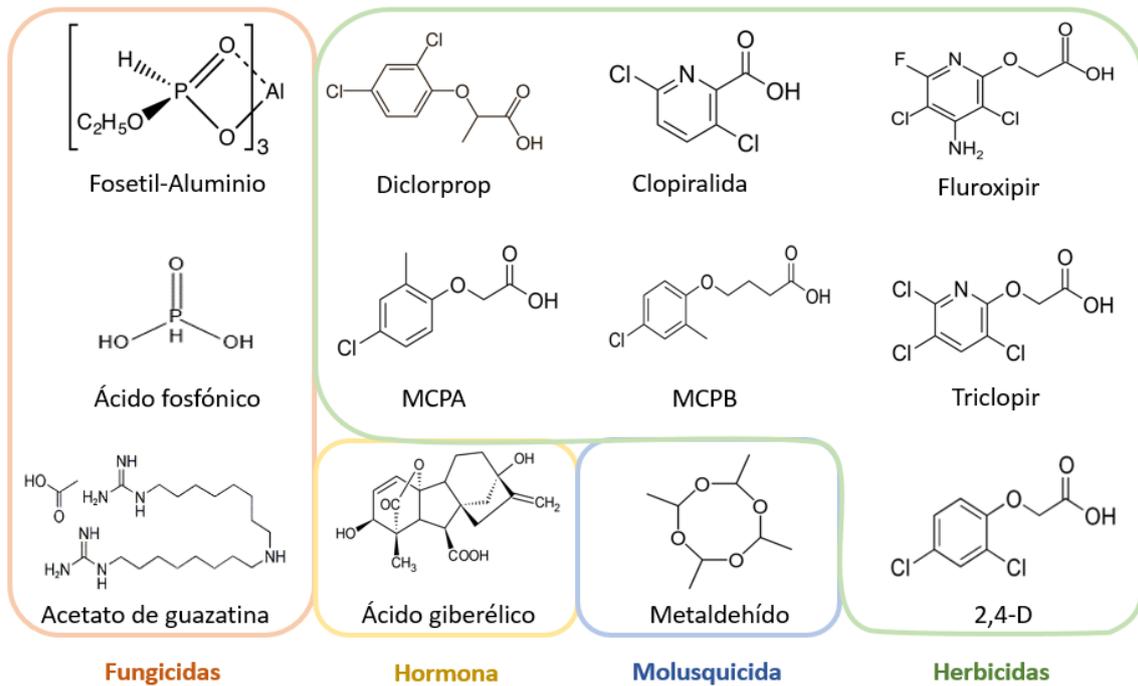


Figura 3. Plaguicidas empleados para desarrollar los dos métodos.

### 3.3- Cromatografía líquida de alta eficacia

La cromatografía se define como una técnica de separación de dos o más componentes de una muestra que se distribuye en dos fases: una fase móvil que se encuentra en fase líquida, así como la muestra a separar y una fase estacionaria que se encuentra en fase sólida (normalmente), en el interior de la columna cromatográfica. La fase móvil y la muestra son bombeadas por unas bombas de alta presión por toda la columna. Al pasar por la citada columna, el analito establece interacciones con la fase estacionaria y se retiene, mientras que los demás componentes salen eluidos. Por lo tanto, se consigue que se separe de los demás compuestos de la muestra y termina registrándose en el detector, que mide su señal para generar un cromatograma. Por último, se integra para averiguar su intensidad de señal (Figura 4)<sup>[8]</sup>.

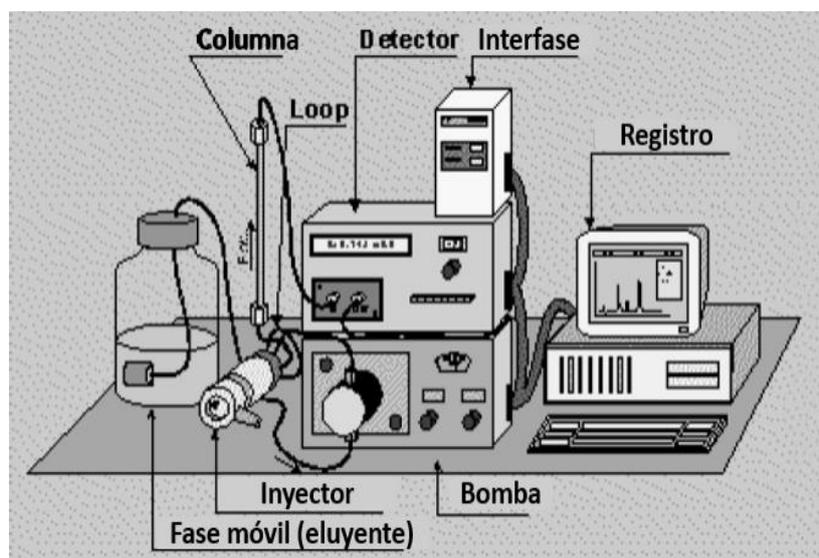
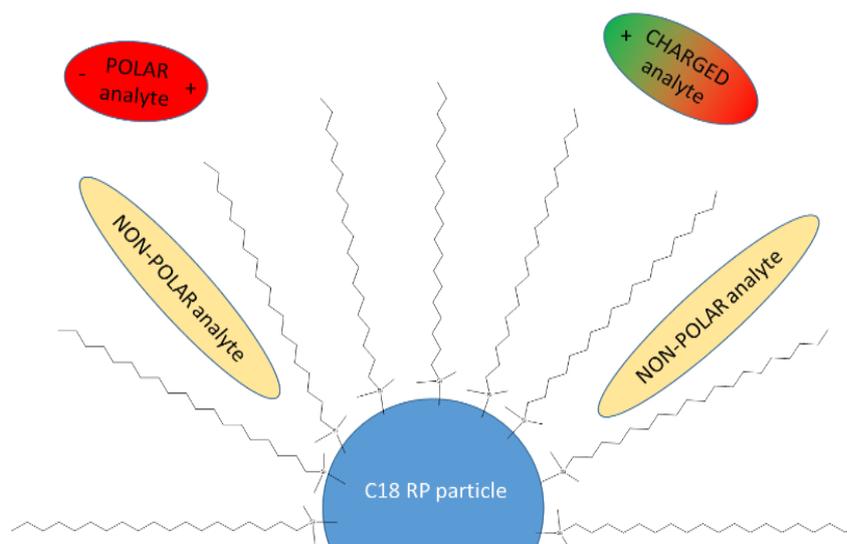


Figura 4. Componentes básicos de la instrumentación para cromatografía líquida de alta resolución<sup>[9]</sup>.

En la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (**HPLC**, en inglés *High Performance Liquid Chromatography*), la fase móvil es típicamente impulsada a caudales de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  a 2 mL/min, llegando hasta la columna a unas presiones de 100-200 atm por un diámetro interno de 2 a 5 mm. Las longitudes de estas suelen variar de 5 cm a 25 cm, caracterizándose por ser resistentes ya que tienen que aguantar altas presiones. La fase estacionaria contiene partículas que rondan el tamaño de 3 a 5  $\mu\text{m}$ <sup>[8]</sup>.

La técnica HPLC posee distintos mecanismos de separación en función del tipo de fase móvil y estacionaria empleada:

- **Fase normal:** Fueron de las primeras columnas que se desarrollaron, en ellas la fase estacionaria es más polar que la fase móvil. La columna generalmente está rellena de sílice enlazada con otro grupo polar (dioles, aminos, cianos). Estos grupos son los que controlan la polaridad de la fase estacionaria. La elución se lleva a cabo con disolventes no polares (dietiléter, cloroformo o n-hexano)<sup>[8]</sup>. Más tarde, se desarrolló una variante de la fase normal como es la Cromatografía Líquida de Interacción Hidrofílica (**HILIC**, en inglés *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*). Se basa en grupos silanos libres que interaccionan con el agua de la fase móvil formando una película acuosa, por lo que, los analitos de la muestra interactúan con la película acuosa para ser retenidos en la columna. La principal ventaja frente a la fase normal comercial es la posibilidad de emplear eluyentes típicos de fase reversa (disolventes orgánicos) aunque se use una fase estacionaria polar. Esto permite separar compuestos polares que no se retienen en fase reversa<sup>[10]</sup>.
- **Fase reversa:** La fase estacionaria es menos polar que la móvil, lo contrario a la fase normal. Dentro del relleno de la fase estacionaria, se usan cadenas hidrocarbonadas de distinta longitud como  $\text{C}_8$  o  $\text{C}_{18}$ , unidas a una base de sílice. La fase móvil está constituida por un disolvente más polar, esto hace que se pueda ir variando o modificando esa polaridad y hacer separaciones más selectivas. Por lo tanto, esta fase es la más versátil en su campo y tiene más aplicaciones que las demás<sup>[8]</sup>. Además, como variante a la fase reversa existe la Cromatografía de Par Iónico (**IPC**, en inglés *Ion-Pair Chromatography*). Se basa en la adición de un reactivo de par iónico a la fase móvil, con el fin de promover la formación de pares iónicos con los analitos de la muestra (previamente regulado el pH para mantener a las especies en forma iónica)<sup>[8]</sup>. Es una alternativa para cuando los analitos presentan cargas y no se consiguen separar por la fase reversa. En este Trabajo Final de Máster se empleó una columna de fase reversa (**Figura 5**), para diseñar un método para determinar plaguicidas ácidos en frutas y en la misma columna con tetrabutilamonio (**TBA**) como reactivo formador de pares iónicos, para elaborar un método para determinar plaguicidas muy polares.
- **Intercambio iónico:** La fase estacionaria es un sólido que contiene grupos cargados tanto positivamente como negativamente, para lograr separar especies iónicas dentro de la muestra (analito). Mediante un mecanismo de atracción iónica en donde las cargas opuestas se atraen a la fase estacionaria por la fuerza electrostática<sup>[8]</sup>.
- **Modo mixto:** Esta técnica se desarrolló debido a la necesidad de un mejor control en la retención de moléculas tanto polares como apolares, que no ofrecían las columnas de fase reversa sobre la retención de compuestos iónicos polares o las de intercambio iónico que no retienen compuestos apolares. La ventaja es la creación de una columna que tenga al mismo tiempo la fase reversa e intercambio iónico, lo que permite un mayor rango de aplicaciones que las otras, como es el análisis simultáneo de compuestos orgánicos e inorgánicos, polares como no polares, incluso neutros o ionizables<sup>[12]</sup>.



**Figura 5.** Composición de la columna de fase reversa empleada, Atlantis T3<sup>[11]</sup>.

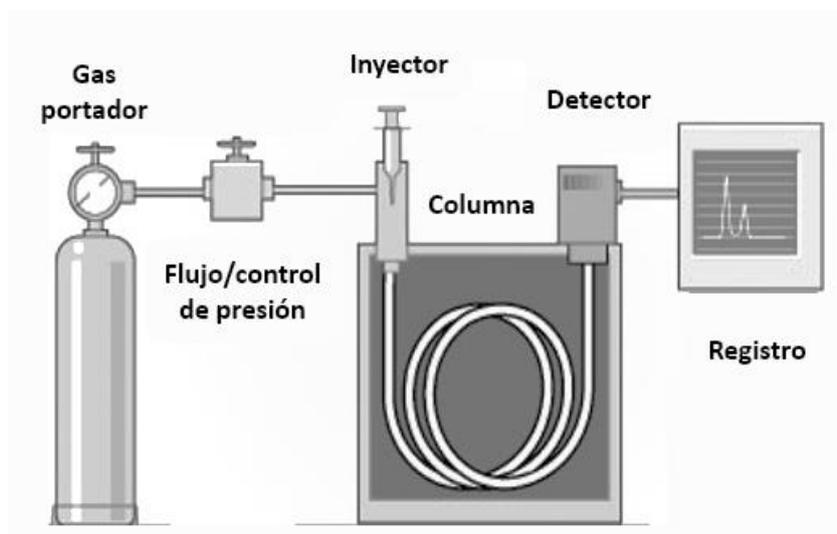
Existen otros tipos de cromatografías como la de exclusión molecular, afinidad, reparto o adsorción que son utilizadas como técnica de purificación más que de análisis cromatográfico.

### 3.4- Cromatografías de gases

La cromatografía de gases (**GC**, en inglés *Gas Chromatography*), al igual que en HPLC, los componentes de una solución se separan en la columna en función de su afinidad. Pero en este caso, la muestra se vaporiza a altas temperaturas en el inyector y el gas portador (fase móvil) lleva el vapor a la columna. En la columna se encuentra la fase estacionaria en fase líquida (habitualmente) o sólida y los analitos se distribuyen entre las dos fases estableciendo interacciones, tanto con la fase estacionaria como con la fase móvil. En función de su afinidad con la fase estacionaria, los analitos serán eluidos con anterioridad o posterioridad hacia el detector, siendo transportados por la fase móvil, midiendo a continuación la señal eléctrica que producen para generar un cromatograma. Por último, se integra para averiguar su intensidad de señal (**Figura 6**)<sup>[13]</sup>.

Dentro de GC, la fase móvil es impulsada a caudales de 0.5 mL/min a 60 mL/min, llegando hasta la columna a unas presiones de 10-25 psi por un diámetro interno que varía de 0.1-5  $\mu\text{m}$ . Las longitudes de éstas suelen variar de 1 m a 60 m, en función de si es una columna empaquetada o capilar, además del espesor de la fase estacionaria puede ser de 0.1-10  $\mu\text{m}$ , dependiendo de si se trabaja con compuestos de alto peso molecular o volátiles<sup>[13]</sup>.

La rampa de temperatura es otro parámetro a optimizar. Lo ideal es trabajar a temperatura constante, pero si se dispone de varios componentes en una muestra, puede haber solapamiento entre picos. Para evitarlo, se puede definir una rampa de temperatura programable, tanto para aumentar como para disminuir la temperatura del horno en función del tiempo, ya sea de forma continua o por etapas. Al principio se comienza normalmente con temperaturas bajas para la elución, ya que de lo contrario se puede descomponer el analito, y al final con una etapa de limpieza de columna a elevadas temperaturas. De esta manera, se consiguen eliminar las impurezas de la columna, además de una etapa de acondicionamiento y vuelta a las condiciones iniciales para el siguiente análisis<sup>[13]</sup>.



**Figura 6.** Componentes básicos de la instrumentación para cromatografía de gases<sup>[14]</sup>.

La técnica GC posee distintos mecanismos de inyección que se definen a continuación:

- **Split:** La inyección *Split* es el enfoque clásico para la introducción de muestras en columnas capilares. Las muestras se vaporizan en un tubo de vidrio calentado. Una pequeña porción del solvente combinado con vapor se introduce en la columna capilar. La mayoría de la muestra inyectada vaporizada sale a través de la ventilación *Split*. La concentración del analito debe ser alta (alrededor de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ), por lo que no es una técnica de alta sensibilidad<sup>[15]</sup>.
- **Splitless:** la inyección *Splitless* se basa en inyectar toda la muestra en la columna. El modo operación, comienza cerrando la válvula de *Split*, para que la muestra vaporizada (es decir, solvente y soluto) pueda ser arrastrada a la columna por el gas portador. Al final de este proceso, la válvula de *Split* se vuelve a abrir para purgar la cámara de vaporización cuando aproximadamente el 90% o más de la muestra ha pasado por la columna y así limpiar impurezas. Esta técnica de inyección *Splitless* es necesaria para concentraciones muy bajas de analitos<sup>[15]</sup>.
- **On-column:** La inyección *on-column* se basa en inyectar toda la muestra con una jeringa directamente a la entrada de la columna o en una precolumna sin recubrimiento. Durante el proceso de inyección, el gas portador redistribuye el líquido de la jeringa sobre una película en la pared del tubo. Este modo de inyección proporciona los medios más fiables o reproducibles de introducción de muestras en la columna. Esta reproducibilidad se establece debido a que en la evaporación del disolvente se produce a partir de la capa de líquido de muestra que se encuentra sobre la superficie de la columna. Esta técnica, puede soportar volúmenes de muestra de hasta  $100 \mu\text{L}$ , lo que permite conseguir límites de detección (**LOD**) extremadamente bajos, en términos de  $\text{mg L}^{-1}$ <sup>[15]</sup>.
- **Programmable temperature vaporization (PTV):** En la inyección PTV, la muestra se inyecta en un inserto a temperatura ambiente y se calienta rápidamente en una segunda fase con un gradiente de temperatura programable, permitiendo que cada compuesto se evapore en función de su punto de ebullición. Una variante consiste en mantener el inserto del inyector a una temperatura adecuada para la evaporación por la válvula de *Split*, manteniendo en el *liner* (cámara de mezcla) los compuestos de interés de mayor punto de evaporación. Este procedimiento puede repetirse varias veces para conseguir la concentración de analitos a nivel de trazas. Tras varias inyecciones se calienta el *liner*

para vaporizar los compuestos de interés preconcentrados e introducirlos en la columna. Un inyector PTV puede funcionar en *Split/Splitless* y también en inyección de grandes volúmenes de muestra (LVI)<sup>[16]</sup>.

### 3.5- Espectrometría de masas

La cromatografía tanto de gases como líquida tiene como característica fundamental la separación, pero se le puede acoplar un analizador de espectrometría de masas, formando lo que se conoce como una técnica híbrida (HPLC-MS y GC-MS)<sup>[17]</sup>, que proporciona información estructural del analito. Esta técnica híbrida tiene diversas aplicaciones debido a sus buenos parámetros de calidad como son: elevada sensibilidad y, amplios intervalos de linealidad, entre otros, que hacen que sea una técnica muy versátil pudiendo identificar y cuantificar sustancias a partir de unos 100 pg a 100 ng<sup>[18]</sup>.

El GC trabaja a baja presión, a altas temperaturas y caudales bajos. En cambio, el HPLC trabaja a alta presión, a temperatura ambiente y caudal de líquidos alto. Mientras que el MS opera con gases a alto vacío y a elevada temperatura lo que hace que sea más difícil su acoplamiento con el HPLC que con el GC. Esta falta de compatibilidad con HPLC se concentra en unos problemas que hay que resolver:

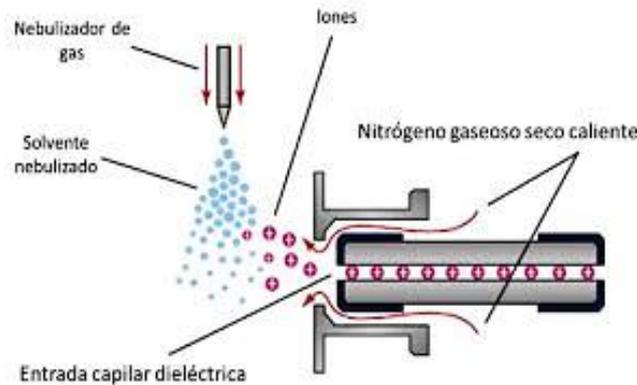
- El flujo de la fase móvil: Un flujo de 1 mL/min en un líquido puede pasar a más de 1 L/min de gas al ser vaporizado y por tanto se deberá eliminar a vacío, lo que conlleva a una pérdida de disolvente y también de soluto, ya que va en él disuelto. Esto acaba disminuyendo la sensibilidad del método.
- Las características de la fase móvil: Los disolventes orgánicos o acuosos utilizados como fases móviles pueden dar lugar a problemas en el acoplamiento. Por si fuera poco, algunos pueden contener aditivos inorgánicos no volátiles que entrarían dentro del espectrómetro de masas.
- Las características de los compuestos eluidos: Con la cromatografía líquida se pueden analizar moléculas complejas de baja volatilidad, termolábiles y de elevada polaridad. Estas moléculas en el espectrómetro de masas presentan dificultades, ya que son difíciles de vaporizar sin descomposición.

Por otro lado, para GC la falta de compatibilidad genera dichos problemas:

- La presión: El espectrómetro de masas necesita trabajar a altas presiones para que los iones viajen sin colisiones a través de él. Este paso tiene que ser más largo que la distancia que existe entre la fuente de iones y el detector. Para ello, se deberá trabajar a presiones de  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  torr.
- Las características del extracto de la muestra: Los disolventes utilizados para extraer a los analitos de la muestra, a la hora de inyectarlos pueden dar lugar a problemas a la hora de volatilizarse por su punto de ebullición.

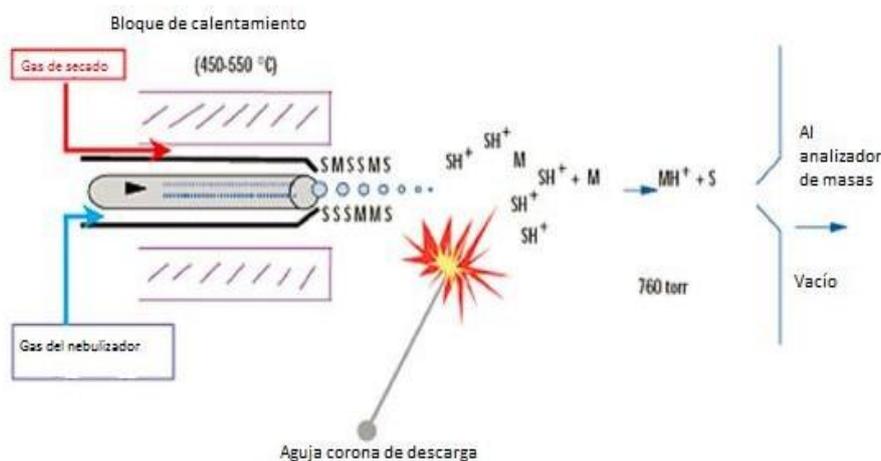
Estos problemas se trataron de resolver por medio de diferentes interfases. Las interfases se dividen en 2 técnicas, técnicas duras (genera un ion con tal exceso de energía que se fragmenta la molécula) y técnicas suaves (genera el ion sin perturbar la molécula). En HPLC se utilizan las técnicas suaves obteniendo un rendimiento adecuado y siendo la interfase más usada la de ionización a presión atmosférica (API). Dentro de API, se pueden distinguir 3 tipos de interfases: la ionización por electrospray (ESI), la ionización química a presión atmosférica (APCI) y la fotoionización a presión atmosférica (APPI)<sup>[18]</sup>. Por el contrario, para GC se pueden emplear ambas técnicas para la interfase, como técnica dura se suele emplear impacto electrónico (EI) y para la técnica suave se emplea la ionización química (CI).

En **ESI**, la columna está ligada a un capilar cuya salida está conectada a un campo eléctrico elevado que cuando interactúan con la muestra, da lugar a la formación de gotas pequeñas cargadas en una cámara de presión atmosférica (**Figura 7**). Esta aplicación del campo eléctrico provoca cargas en el soluto cuando se va eliminando el disolvente<sup>[18]</sup>. Dentro de sus ventajas resaltan su elevada sensibilidad porque tiene una alta eficacia de ionización a presión atmosférica y menores requisitos de optimización que otras técnicas<sup>[8]</sup>.



**Figura 7.** Esquema de funcionamiento del ESI<sup>[19]</sup>.

La **APCI** se lleva a cabo mediante un eluyente de la columna que se arrastra mediante un flujo de un gas inerte ( $N_2$ ) hasta un tubo caliente en donde se vaporiza. La descarga de la aguja de corona produce los electrones necesarios para conseguir la ionización química en una zona a presión atmosférica. Al finalizar, los iones se incorporan en el espectrómetro de masas a través de unas rendijas siendo bombeados en dos o más etapas para conseguir el vacío necesario (**Figura 8**). Las principales ventajas de esta interfase es la posibilidad del uso de agua como fase móvil y poder tener flujos más elevados (2 mL/min)<sup>[8,18]</sup>.



**Figura 8.** Esquema de la interfase APCI<sup>[15]</sup>.

**APPI** es igual que la interfase anterior, pero con ionización de electrones mediante lámpara UV (**Figura 9**)<sup>[15]</sup>.

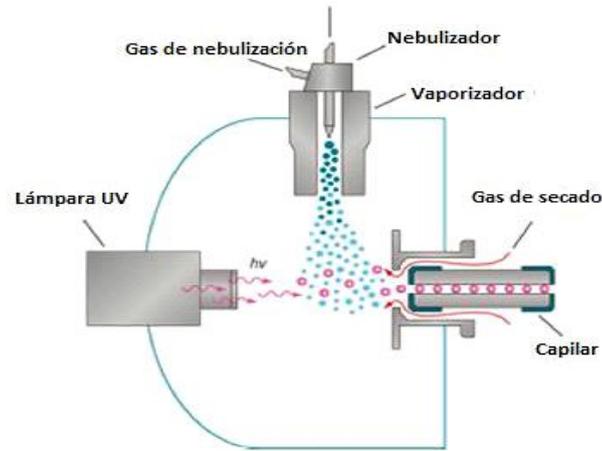


Figura 9. Esquema de la interfase APPI<sup>[19]</sup>.

En **EI** las moléculas sufren un impacto directo de un chorro de electrones a 70 eV, en forma perpendicular producidos por un filamento, y como consecuencia, pierden un electrón. Al mismo tiempo, la molécula gana mucha energía interna y puede generar fragmentos. A continuación, las lentes con carga opuesta a los iones de interés, los enfocan al interior del analizador de masas (**Figura 10**)<sup>[15]</sup>.

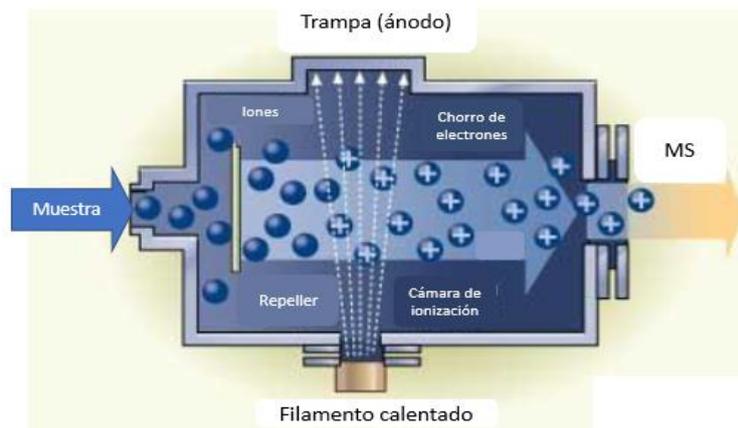


Figura 10. Esquema de la interfase EI.

En **CI**, un gas (metano, isobutileno, amoníaco, metanol) sufre el impacto de un chorro de electrones y se ioniza. El gas ionizado reacciona con las moléculas de la muestra y adquieren un protón y muy poca energía interna (**Figura 11**)<sup>[15]</sup>.

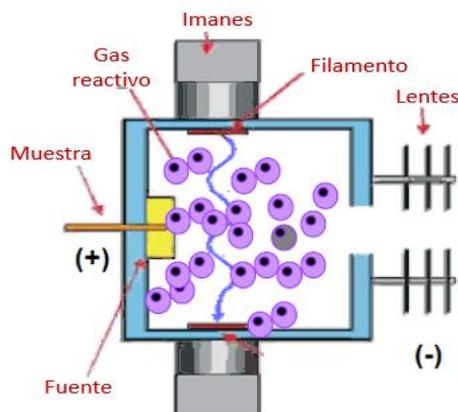
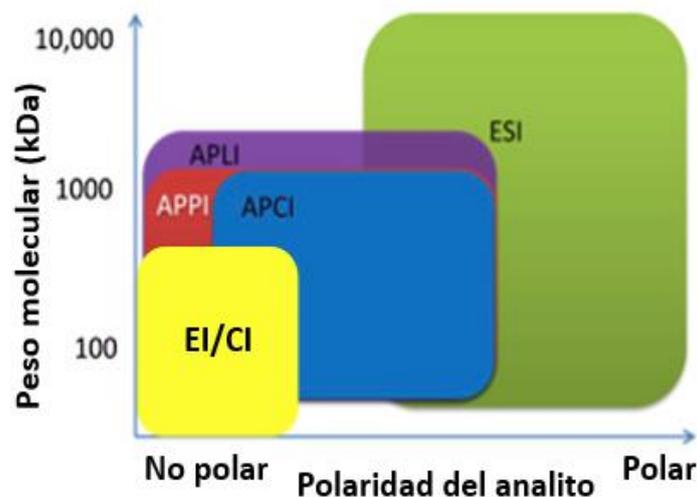


Figura 11. Esquema de la interfase CI.

Dependiendo de las características físico-químicas del analito que queramos cuantificar utilizaremos una interfase u otra. Por un lado, para HPLC tenemos que el ESI sirve para moléculas polares y para un amplio rango de pesos moleculares. En cambio, el APCI se usa para moléculas de un amplio rango de polaridades, pero de tamaño inferior a 1000 Da. Por último, el APPI se usa para moléculas apolares neutras que resultan difíciles de ionizar con las otras dos interfases. Por otro lado, para GC, el EI y CI funcionan de manera similar tanto en cuanto a rango de polaridades (no polar) como de pesos moleculares (bajo peso molecular), por lo que su diferencia radica en la alta fragmentación en la interfase del EI y la protonación del ion molecular en CI (**Figura 12**)<sup>[15]</sup>.



**Figura 12.** Relación entre las diferentes interfases en función del peso molecular y polaridad del analito<sup>[20]</sup>.

En la determinación de plaguicidas muy polares y ácidos por la gran variedad de pesos moleculares, la técnica más adecuada es ESI. Además, este sistema es el más usado dentro de este ámbito en el HPLC-MS.

### 3.5.1- Analizadores de Espectrometría de Masas

Una vez ionizados los analitos, ahora tienen que ser separados en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ) y medirlos. Dentro de este apartado, tenemos muchos analizadores de masas: Cuadrupolo (**Q**), Tiempo de Vuelo (**TOF**), Trampa de Iones (**IT**), Orbitrap, Sector Magnético de Doble Enfoque, Resonancia Ciclotrónica de Iones con Transformada de Fourier (**ICR-FT**) etc. En este Trabajo Fin de Máster, se usó un sistema híbrido compuesto por el primero, por lo que solo se hablará de él<sup>[15]</sup>.

- **Cuadrupolo (Q)**

El cuadrupolo es un sistema de analizador multipolar junto con el octapolo o hexapolo. Este analizador, se compone de cuatro barras paralelas en las que se aplica un potencial combinado de corriente continua y otro de radiofrecuencia. Se genera un campo eléctrico en las barras (cuadrupolar) y actúa como un filtro para determinar los iones que llegarán al detector (**Figura 13**)<sup>[21]</sup>. Estos potenciales se pueden variar para seleccionar los iones de interés que necesitamos y así atravesar el filtro de masas. Los potenciales aplicados a los dos pares de rodillos son iguales, pero de signo opuesto y cuando se requiere hacer un barrido sobre un rango de masas, el potencial de la corriente continua varía linealmente, pero se mantiene constante la relación entre el potencial de radiofrecuencia y la corriente continua aplicada<sup>[15]</sup>.

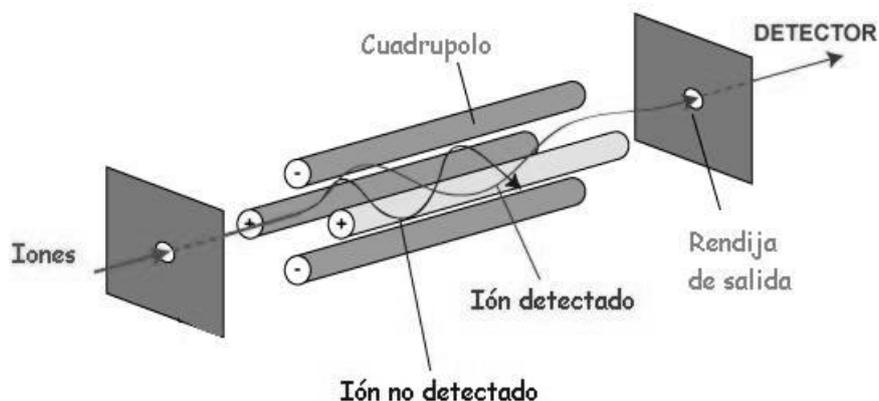


Figura 13. Esquema del funcionamiento de un analizador cuadrupolo<sup>[22]</sup>.

Dentro de las ventajas que nos puede ofrecer el analizador: destacan su pequeño tamaño, su gran robustez y que no requiere un elevado vacío para su funcionamiento, por lo tanto, se acopla bien a las técnicas cromatográficas. Sin embargo, su resolución es baja<sup>[15]</sup>.

### 3.5.2- Detectores de masa

Existen múltiples detectores con diversas funciones: Multiplicador de electrones<sup>-</sup>, Dínodos de red, Fotomultiplicadores etc. Los más usados son el Multiplicador de electrones<sup>-</sup> y el Detector con Placa de Microcanales (MCP)<sup>[15]</sup>.

- **Multiplicador de e<sup>-</sup>:** Este detector está recubierto de una placa metálica y el ion golpea contra ella emitiendo electrones. Debido a la existencia de un potencial creciente y una curva de dínodos, este proceso se repite muchas veces, y como consecuencia se generan sobre  $10^5$ - $10^6$  electrones por cada ion que impacta, permitiendo que se amplifique la señal (Figura 14).

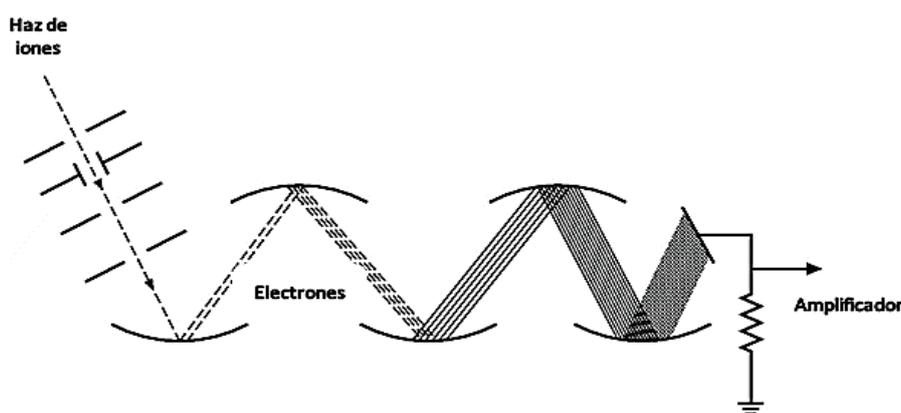


Figura 14. Esquema del funcionamiento de un detector multiplicador de electrones<sup>[15]</sup>.

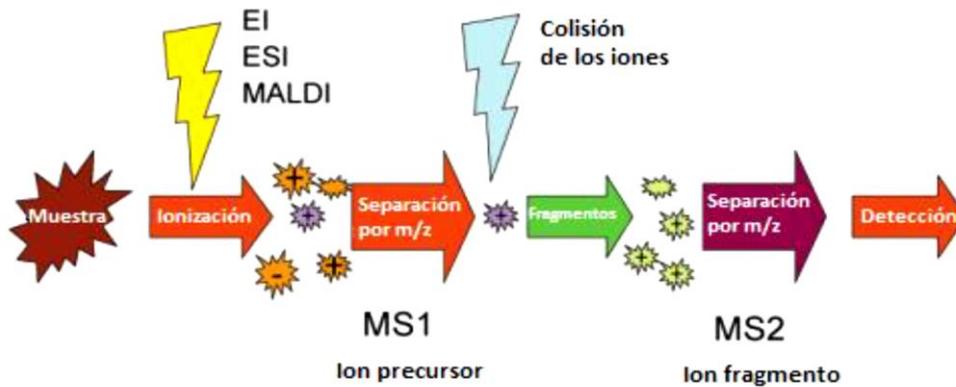
- **MCP:** Su funcionamiento es semejante al anterior, pero con la ventaja de tener resolución espacial debido a los canales separados de la placa.

### 3.5.3- Espectrometría de masas en tándem

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) permite seleccionar los iones (analitos) y fragmentarlos para luego obtener sus patrones de fragmentación y así poder llegar a confirmar los diferentes compuestos de una muestra (Figura 15).

Este proceso comprende 5 etapas:

1. Ionización del analito.
2. Aislamiento del ion precursor.
3. Fragmentación de ese ion en una cámara de colisión.
4. Separación de los fragmentos en función de su relación m/z.
5. Detección de dichos fragmentos, para su posterior procesado

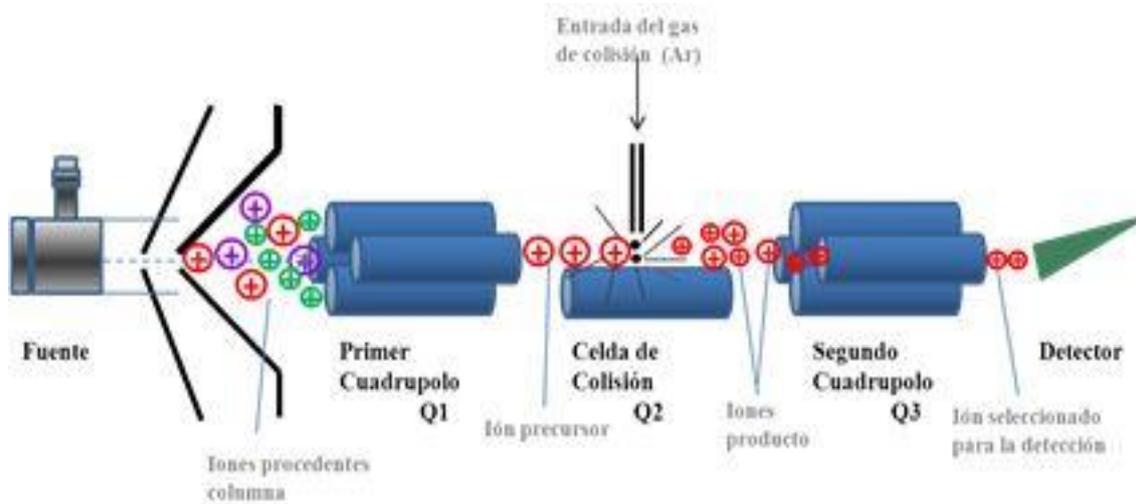


**Figura 15.** Estructuración del funcionamiento de la Espectrometría de Masas en Tándem.

Hay varios equipos que pueden realizar estas funciones, los más usados serían el triple cuadrupolo (QqQ) y el Cuadrupolo-Tiempo de Vuelo (QTOF). En este trabajo, se usó solo la espectrometría de masas en tándem, con un sistema QqQ.

- **Triple Cuadrupolo (QqQ)**

El QqQ es una disposición tándem como se ilustra en la **figura 16**, en la cual el primer y tercer cuadrupolo son selectivos con respecto a la masa y el segundo hexapolo opera en modo radiofrecuencia (RF), dejando pasar todos los iones y sirve como celda de colisión. El primer cuadrupolo se usa para la selección de iones precursores después de la ionización. El ion precursor se transmite a la celda de colisión, en la que se fragmentan debido a que el gas de colisión (Ar) entra de forma perpendicular a los iones y choca con ellos. El tercer cuadrupolo proporciona un medio para analizar todos los iones producto que emergen de la celda de colisión<sup>[15]</sup>.



**Figura 16.** Esquema del funcionamiento de un analizador Triple Cuadrupolo<sup>[23]</sup>.

Esta técnica destaca por su sensibilidad y selectividad en *Selected Reaction Monitoring* (**SRM**), en la cual seleccionamos los iones precursores y producto que necesitamos. Por lo tanto, es ideal para la cuantificación de muestras. Además, es una técnica sencilla, resistente, reproducible y de fácil mantenimiento. En cambio, trabaja en masa nominal<sup>[15]</sup>.

**ANÁLISIS  
DE RUTINA**

## **4. Análisis de rutina**

### **4.1- Material**

- Agitador de probetas
- Balanza analítica, Mettler Toledo
- Balanza granataria, Mettler Toledo
- Bolsa hermética de plástico, Vidra Foc
- Botella de vidrio ámbar con tapón rosca de 60, 30 y 10 mL, Vidra Foc
- Centrífuga, Ortoalresa
- Colorímetro, Hanna
- Conductímetro, Crison
- Congelador, Indesit
- Cronómetro, Scharlau
- Erlenmeyer de 100 y 250 mL, Vidra Foc
- Exprimidor Vitapress 600, Tefal
- Filtros de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , Agilent
- Frigorífico, LG
- Jeringuilla desechable, Henke-Sass Wolf
- Material de vidrio/metal de uso habitual en el laboratorio
- Matraz aforado de 10, 20, 50 y 100 mL, Scharlau
- Micropipetas automáticas de 1-10 mL, 10-100  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$ , Transferpette
- pH-metro, Crison
- Pipetas de 1, 2.5, 5, 10 y 20 mL, Scharlau
- Pipetas Pasteur, Brand
- Puntas de plástico para diferentes micropipetas, Brand
- Refractrómetro, Atago
- Rotavapor, Heidolph
- Septum PTFE, Agilent
- Thermomix, Vorwerk
- Tiras reactivas de pH, Macherey-Nagel
- Tubos Falcon de 15 mL, Deltalab
- Tubo Falcon de 50 mL, Teknokroma
- Tubo QuEChERS de extracción, Teknokroma
- Vaso de precipitados de 100 mL, Vidra Foc
- Viales de vidrio ámbar de 2 mL, Agilent
- Viales de vidrio transparentes de 2 mL Agilent

### **4.2- Reactivos y patrones**

- Acetato de etilo, Panreac (España)
- Acetona calidad HPLC-MS, Fluka (Suiza)

- Acetonitrilo calidad HPLC-MS, PanReac (España)
- Agua calidad HPLC-MS, Honeywell (EEUU)
- Ciclohexano, Panreac (España)
- Fenolftaleína, Sigma-Aldrich (EEUU)
- Hidróxido de sodio, Panreac (España)
- Metanol calidad HPLC-MS, Honeywell (EEUU)
- Nitrógeno gas, Praxair (EEUU)
- Argon gas, Praxair (EEUU)
- Octadecilsilano, Agilent (EEUU)
- Sulfato de magnesio, Panreac (España)
- Patrones empleados:
  - Fenantreno-D<sub>10</sub>, Supelco (EEUU)
  - Trifenilfosfato, Dr Ehrenstorfer GmbH (Alemania)

### 4.3- Instrumentación

La realización de los análisis multiresiduales de rutina se llevaron a cabo mediante un cromatógrafo de líquidos y un cromatógrafo de gases, ambos acoplados a un sistema de espectrometría de masas, en concreto un triple cuadrupolo (**HPLC-QqQ** y **GC-QqQ**). El cromatógrafo de líquidos es un Agilent Technologies 1260 Infinity II HPLC System que consiste en una bomba cuaternaria de mezcla a alta presión, un compartimento termostatzado de columna y un muestreador automático. El espectrómetro de masas es un Agilent Technologies 6460 Triple Quad HPLC/MS con una interfase ESI y un analizador de masas QqQ (**Figura 17**).



**Figura 17.** Imagen del equipo HPLC-QqQ empleado para el análisis de rutina.

En cambio, el cromatógrafo de gases es un Agilent Technologies 7890B GC System que consiste en un horno programable, inyector multimodo y un muestreador automático.

El espectrómetro de masas es un Agilent Technologies 7000C Triple Quad GC/MS con una interfase EI y un analizador de masas QqQ (**Figura 18**).



Figura 18. Imagen del equipo GC-QqQ empleado para el análisis de rutina.

#### 4.4- Muestras

Las muestras empleadas para los análisis de rutina fueron muy variadas, debido a que iba en función de la temporada de recogida de las diferentes frutas. La gran mayoría de muestras fueron de naranjas y mandarinas debido a la gran extensión de naranjos ubicados en la zona próxima a la empresa. Pero también se analizaron muestras de melón, fresa, caqui, limón, albaricoque, nectarina, sandía y melocotón.

Por otra parte, se llevaron a cabo análisis fisicoquímicos de aguas provenientes de pozos y ríos, que podían ser para uso potable o de regadío.

#### 4.5- Preparación de soluciones patrón y multipatrón

- Disolución patrón  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  (DPATpatrón)

Se pesó en una balanza analítica de precisión  $\pm 0.1 \text{ mg}$ ,  $(20 \pm 2.0) \text{ mg}$  de patrón directamente en un aforado de  $20 \text{ mL}$ . En el caso de GC, se utilizó como disolvente acetona. Para HPLC se utilizó de manera habitual metanol, aunque también podrían utilizarse acetonitrilo o acetona, de modo que dependiendo de la solubilidad del compuesto se escogió uno u otro. Se trasvasó a un vaso de precipitados de  $100 \text{ mL}$ . Luego, se agitó, enrasó y sonicó durante  $5$  minutos y se trasvasó a una botella de vidrio ámbar con tapón rosca de  $30 \text{ mL}$ . En la identificación se incluía el nombre del plaguicida, fecha de preparación y caducidad, iniciales del operador, concentración y disolvente empleado.

- Disolución multipatrón de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (MPGC10/MPGCA10)/(MPLC10/MPLCA10)

Se pipetearon  $500 \mu\text{L}$  de cada una de las disoluciones patrón ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) con una pipeta automática y se vertieron a un matraz aforado de  $50 \text{ mL}$ . Después, se enrasó con AcOEt en GC, MeOH en el caso de HPLC y se sonicó durante  $1$  minuto. Esta disolución, se dividió en  $6$  botellas de vidrio ámbar con tapón rosca y septum PTFE de  $10 \text{ mL}$ , usándose una cada mes. Las diferentes disoluciones se identificaron en una etiqueta con el nombre, fecha de preparación, caducidad y disolvente utilizado.

- Disolución multipatrón 1 mg L<sup>-1</sup> de todos los plaguicidas (MPGCA1)/(MPLCA1)

Se pipetearon con una pipeta aforada 5 mL de la disolución multipatrón MPGC10 (GC) o MPLC10 (HPLC) y otros 5 mL de la disolución multipatrón MPGCA10 (GC) o MPLCA10 (HPLC) y se trasvasaron a un matraz aforado de 50 mL. Después, se enrasó con AcOEt (GC) o MeOH (HPLC) hasta 50 mL y se sonicó durante 1 minuto. A continuación, se trasvasó a 5 botellas de vidrio ámbar con tapón de rosca y septum PTFE de 10 mL, que se utilizaron consecutivamente una cada semana.

- Disolución patrón interno 400 mg L<sup>-1</sup> (IS400)

En una balanza analítica se pesó  $20 \pm 2.0$  mg de patrón interno (Fenantreno-D<sub>10</sub>) y se introdujeron en un matraz aforado de 50 mL. Luego, se enrasó con ciclohexano y se sonicó durante 5 minutos. Finalmente se trasvasó a una botella de vidrio con tapón de rosca de 60 mL.

Disolución de patrón interno 4 mg L<sup>-1</sup> IS4 (GC): Se pipetearon 0.5 mL de IS400 con una pipeta automática que se trasvasaron a un aforado de 50 mL. El enrasado fue con AcOEt y sonicación durante 1 minuto. El contenido se dividió en 2 botellas de vidrio ámbar con tapón rosca y septum PTFE de 30 mL, como siempre, debidamente etiquetadas.

Disolución patrón interno ISLC10 (HPLC): Se pipetearon 500 µL de la disolución patrón (1000 mg L<sup>-1</sup>) de Trifenilfosfato (TPP) con una pipeta automática y se vertieron en un matraz de 50 mL. A continuación, se enrasó con acetona para análisis de residuos y se sonicó durante 1 minuto. Finalmente, se trasvasó a una botella de vidrio de 60 mL con tapón rosca.

#### 4.6- Recta de calibrado

La recta de calibrado se preparó de distinta forma en función de las distintas técnicas. En el caso de GC se siguieron los pasos que se muestran a continuación:

- A0  $\approx$  0.005 mg L<sup>-1</sup>

Se pipetearon con pipeta automática 4 mL del extracto de matriz blanco y se trasvasaron en un aforado de 10 mL. A esto, se le añadió 0.040 mL de la disolución IS4 y 0.020 mL de la disolución MPGCA1, con el posterior enrase en AcOEt con agitación manual y sonicación durante 1 minuto. La disolución se trasvasó a viales de 2 mL identificándolo con el nombre y la fecha de preparación.

En la **tabla 1** se muestra un resumen de la preparación de los diferentes puntos del calibrado para GC.

**Tabla 1.** *Tabla resumen de los puntos del calibrado para GC.*

	A0	A1	A2	A3	A4	A5
<b>Conc (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0.005	0.010	0.025	0.050	0.100	0.200
<b>V (extracto blanco) (ACN) (mL)</b>	4	4	4	4	4	4
<b>V (IS4) (AcOEt) (mL)</b>	0.040	0.040	0.040	0.040	0.040	0.040
<b>V (MPA1) (AcOEt) (mL)</b>	0.020	0.040	0.100	0.200	0.400	0.800
<b>VF (AcOEt) (mL)</b>	5.94	5.92	5.86	5.76	5.56	5.16

En cambio, para HPLC los pasos fueron los siguientes:

- $S0 \approx 0.005 \text{ mg L}^{-1}$

Se trasvasaron 0.100 mL de la disolución ISLC10 en un aforado de 10 mL con una pipeta automática. Luego, se añadieron 0.050 mL de la disolución MPLCA1 con la misma pipeta automática. Se enrasó con el extracto blanco (matriz del producto a analizar preparado en ACN). Por último, se agitó manualmente el aforado y se sonicó durante 1 minuto. Para luego, traspasarse a viales de 2 mL, etiquetándolos con el nombre y fecha de preparación.

En la **tabla 2** se muestra un resumen de la preparación de los diferentes puntos del calibrado para HPLC.

**Tabla 2.** Tabla resumen de los puntos del calibrado para HPLC.

	S0	S1	S2	S3	S4	S5
<b>Conc (mg L-1)</b>	0.005	0.010	0.050	0.100	0.150	0.300
<b>V (ISLC10) (MeOH) (mL)</b>	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
<b>V (MPLCA1) (MeOH) (mL)</b>	0.050	0.100	0.500	-	-	-
<b>V (MPLC10) (MeOH) (mL)</b>	-	-	-	0.100	0.150	0.300
<b>V (MPLCA10) (MeOH) (mL)</b>	-	-	-	0.100	0.150	-
<b>VF (extracto blanco) (ACN) (mL)</b>	9.85	9.8	9.4	9.7	9.6	9.6

#### 4.7- Estudio de caducidades y verificación de soluciones patrón y multipatrón

- Disolución patrón  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  (DPAT patrón)

El estudio de estabilidad tiene el fin de establecer el periodo de caducidad adecuado. Se consideró que la primera DPAT 1000 preparada a partir del sólido está correcta y se estableció una caducidad inicial anual siempre que las verificaciones de la MPGCA1 o MPLCA1 estén correctas.

Al año o antes si se detecta algún problema, se prepararán dos disoluciones de los patrones nuevos y de los antiguos, inyectándose por triplicado en la misma tanda.

Para la verificación se preparó un mix a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de las disoluciones antiguas y un mix a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de las nuevas, en AcOEt (GC) o MeOH (HPLC). A partir de las de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , se preparó otra dilución a  $1 \text{ mg L}^{-1}$  en AcOEt (GC) o MeOH (HPLC). Finalmente, se preparó una dilución a  $0.250 \text{ mg L}^{-1}$  en el que se tomaron en GC:  $350 \mu\text{L}$  de AcOEt,  $400 \mu\text{L}$  de extracto blanco y  $250 \mu\text{L}$  de la dilución de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ . En HPLC se tomaron  $750 \mu\text{L}$  de MeOH y  $250 \mu\text{L}$  de la dilución de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , se realizó en este orden para evitar la contaminación del AcOEt o el MeOH del blanco.

Se calculó la media del factor de respuesta para la disolución del patrón antiguo y para la disolución del patrón nuevo y, se compararon estos valores tomando la media de la disolución antigua como 100 %.

Si:

- La diferencia es menor del 10 %: Se utilizará la disolución nueva, pero se guardará la antigua con el fin de compararla con la nueva del siguiente año e ir ampliando la caducidad. Este proceso se realizará hasta una caducidad máxima de 4 años.
- La diferencia es mayor del 10 %: Se volverá a preparar otra disolución (comprobación) para ver cuál de las 2 está mal:
  - ✓ Si la comprobación coincide con la antigua: Se eliminará la nueva (no coincidente) y se utilizará la de comprobación como nueva DPAT1000. También se guardará la antigua para ir ampliando la caducidad.
  - ✓ Si la comprobación coincide con la nueva:  
Puede que:
    - La disolución más antigua esté mal conservada.
    - Caducidad de la disolución sea < 1 año, aunque se debería haber detectado en las verificaciones de MPGCA1 o MPLCA1 mensuales.
    - Sólido caducado: una vez abierto el envase, deja de aplicar la fecha de caducidad del certificado y depende de las condiciones de conservación. En este caso, se pide un nuevo sólido y se comparan las disoluciones de ambos sólidos del modo descrito anteriormente.

En todo caso, se utilizará la disolución más nueva si no se especifica lo contrario en observaciones.

- Disolución multipatrón 10 mg L<sup>-1</sup> (MPGC10/MPGCA10) (MPLC10/MPLCA10)

Para la verificación se preparó la MPGCA1 o MPLCA1 nueva, así como una mezcla de las MPGC10 y MPGCA10 o MPLC10 y MPLCA10 antiguas a 1 mg L<sup>-1</sup> (equivalente a la MPGCA1 o MPLCA1 en uso). Se preparó una dilución a 0.250 mg L<sup>-1</sup> para GC en AcOEt (350 µL AcOEt + 400 µL de extracto blanco + 250 µL MPGCA1), en cambio para HPLC en MeOH (750 µL MeOH + 250 µL MPLCA1) de las disoluciones MPGCA1 o MPLCA1 antigua y de la nueva, se inyectó cada una por triplicado. Además, se realizó la media de las inyecciones y se compararon aceptando una diferencia máxima del 10 % para la mayoría de los plaguicidas. En el caso de encontrar algún resultado que no cumpla significativamente se volverá a realizar la verificación y se realizará un estudio de causas. La caducidad de esta disolución multipatrón es de 6 meses, en cambio, los resultados obtenidos se tuvieron en cuenta en las caducidades de las DPAT1000.

- Disolución multipatrón 1 mg L<sup>-1</sup> (MPGCA1) (MPLCA1)

La preparación y verificación de esta disolución se realizó mensualmente comparando con la nueva disolución con la que está en uso, aceptando como correcta la preparación si la diferencia para la mayoría de los plaguicidas es menor del 10 %. La verificación se realizó preparando una dilución a 0.250 mg L<sup>-1</sup> en GC fue con 350 µL AcOEt + 450 µL extracto blanco + 250 µL MPGCA1 y en HPLC fue con MeOH, 750 µL MeOH + 250 µL MPLCA1. En el caso de encontrarse algún resultado que no cumpla significativamente se volverá a realizar la verificación y se estudiarán las causas si se considera necesario.

- Disolución patrón interno (IS4)

La preparación y verificación de la IS4 se realizó mensualmente. Para ello, se preparó una dilución a 0.200 mg L<sup>-1</sup> en AcOEt (550 µL AcOEt + 400 µL extracto blanco + 50 µL IS4) de la IS4 antigua y nueva, aceptándose una diferencia máxima del 10 %.

- Disolución patrón interno (ISLC10)

La preparación y verificación de la ISLC10 se realizó cada dos meses. Para verificar, se preparó una dilución a  $0.250 \text{ mg L}^{-1}$  con MeOH ( $750 \mu\text{L MeOH} + 250 \mu\text{L ISLC10}$ ) de la ISLC10 antigua y nueva, aceptándose una diferencia máxima del 10 %.

#### 4.8- Preparación de muestras

##### 4.8.1- Análisis químico de frutas

La preparación de muestra se basa en el método de extracción en fase sólida dispersiva (QuEChERS). Los pasos para llevar a cabo el tratamiento de las muestras son parecidos para las diferentes variedades de fruta y técnicas empleadas (con alguna variación) y, se muestran a continuación (Figuras 19 y 20):

Las muestras se trituraron y homogeneizaron con una Thermomix. El triturado, se pasó a una bolsa hermética de plástico etiquetada con su fecha e identidad. En el caso de ser blanco se identificó como BM y en el caso de ser muestra fortificada, MF. Las muestras fortificadas se estudiaron una vez por tanda, al nivel de cuantificación y adicionalmente una vez por semana se consideró a  $0.100 \text{ mg/Kg}$ . A continuación, se pesó en un tubo Falcon de 50 mL con una balanza granatario de precisión  $\pm 0.1 \text{ g}$ , ( $10.00 \pm 0.2 \text{ g}$ ), se pipetearon  $100 \mu\text{L}$ , en el caso de trabajar a  $0.010 \text{ mg/Kg}$  y  $1000 \mu\text{L}$  a  $0.100 \text{ mg/Kg}$ , de multipatrón MPGCA1 (GC) o MPLCA1 (HPLC) (Tabla 3). Luego, se añadieron  $100 \mu\text{L}$  de IS4 o de ISLC10, dependiendo de la técnica empleada para el análisis. Por último, se dejó en reposo durante 15 minutos tapado.

**Tabla 3.** Volumen añadido de disolución multipatrón para los dos niveles de trabajo.

Disolución empleada	Volumen añadido de multipatrón ( $\mu\text{L}$ )	Conc. final ( $\text{mg/Kg}$ )
MPGCA1 o MPLCA1	100	0.010
MPGCA1 o MPLCA1	1000	0.100

Al finalizar el tiempo, se añadió 10 mL de ACN con agitación manual durante 5 segundos. En naranjas y mandarinas se añadieron 10-12 gotas de NaOH 2 M y en muestras de limón se añadieron 15-20 gotas de NaOH. A la muestra, se le añadió un tubo Falcon QuEChERS de extracción ( $4 \text{ g MgSO}_4 + 1 \text{ g NaCl} + 1 \text{ g citrato sódico} + 0.5 \text{ g citrato disódico sesquihidratado}$ ) y se agitó al momento para evitar que se apelmazasen las sales.

En muestras de naranja, mandarina o limón se comprobó el pH, rectificándose en caso de no estar entre 5-5.5. Después, se agitó durante 5 minutos en el agitador de probetas y se centrifugó durante otros 5 minutos a 4000 rpm.

En el caso de tener como matriz naranja, mandarina, limón o caqui se utilizó una etapa dispersiva (d-SPE:  $900 \text{ mg MgSO}_4 + 400 \text{ mg C}_{18}$ ). Para ello, se trasvasaron 6 mL de sobrenadante a un tubo dispersivo de 15 mL y se repitió la secuencia anterior, agitación durante 5 minutos y centrifugación durante otros 5 minutos a 4000 rpm. Para la fresa, melón, sandía, melocotón y nectarina, no se llevó a cabo esta etapa dispersiva.

En el caso de analizar por GC, se cogió un vial referenciado con su código y se pipeteó  $600 \mu\text{L}$  de AcOEt. Por otro lado, en el análisis por HPLC, con una jeringa se tomó 1 mL de extracto del tubo Falcon y se pasó por un filtro de nylon de  $0.22 \mu\text{m}$  directamente al vial correspondiente con el código. Por último, se trasvasaron  $400 \mu\text{L}$  del extracto filtrado a cada

vial correspondiente al análisis por GC. En cambio, para muestras fortificadas, se utilizó el mismo procedimiento en función de si es GC o HPLC, pero en un vial ámbar de 2 mL.

En el caso de tener muestras de limón y mandarina se pipetearon 500 µL de la muestra fortificada con filtro de nylon de 0.22 µm y se trasvasaron a otro vial, añadiendo 50 µL de extracto blanco de naranja preconcentrado 1:10.

Para finalizar, se hizo el cálculo de la concentración de plaguicidas con referencia a la muestra, en mg/Kg (**Ecuación 1**).

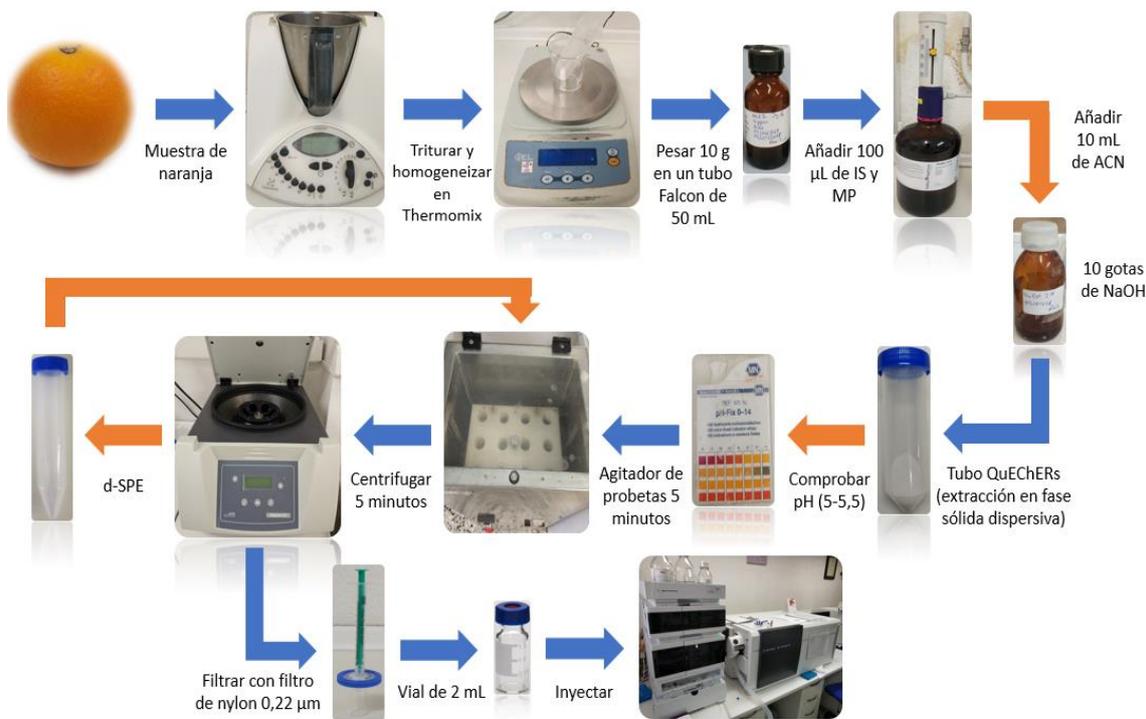
$$\text{Conc. (mg/Kg)} = \text{Conc. (mg L}^{-1}\text{)} \times \text{Volumen añadido de ACN/Cantidad total de muestra}$$

**Ecuación 1.** Cálculo de la concentración en mg/Kg.

Cantidad total de muestra: 0.01 Kg  $\approx$  10 g

Volumen añadido de ACN: 10 mL

En muestras de limón y mandarina, se aplicará el factor (x1.1) para obtener la concentración real al haber añadido extracto de naranja a las muestras.



**Figura 19.** Resumen del pretratamiento de muestra para frutas.

*Nota: Las flechas en naranja, es el pretratamiento que necesitan a mayores las muestras de naranjas, mandarinas y limones.*

El cliente además puede requerir la elaboración de zumo para saber el contenido de azúcar y ácido cítrico de sus naranjas. En este caso, la preparación de muestra se basó en dejar mitad de la naranja para triturar y seguir el procedimiento que anteriormente se detalla; las otras mitades se dejaron apartadas, siendo pesadas en una balanza de precisión  $\pm 0.1$  g. Después, se realizó el zumo con un exprimidor eléctrico en un vaso de plástico y se pesó en la balanza anterior. Con la diferencia de peso se puede saber el % de zumo de la naranja (**Ecuación 2**). Con ese zumo, se calculó el % de Brix que es el % de azúcar, con la ayuda de un refractómetro.

% zumo = (peso del zumo elaborado a partir de la muestra / peso de la muestra de naranja) x 100

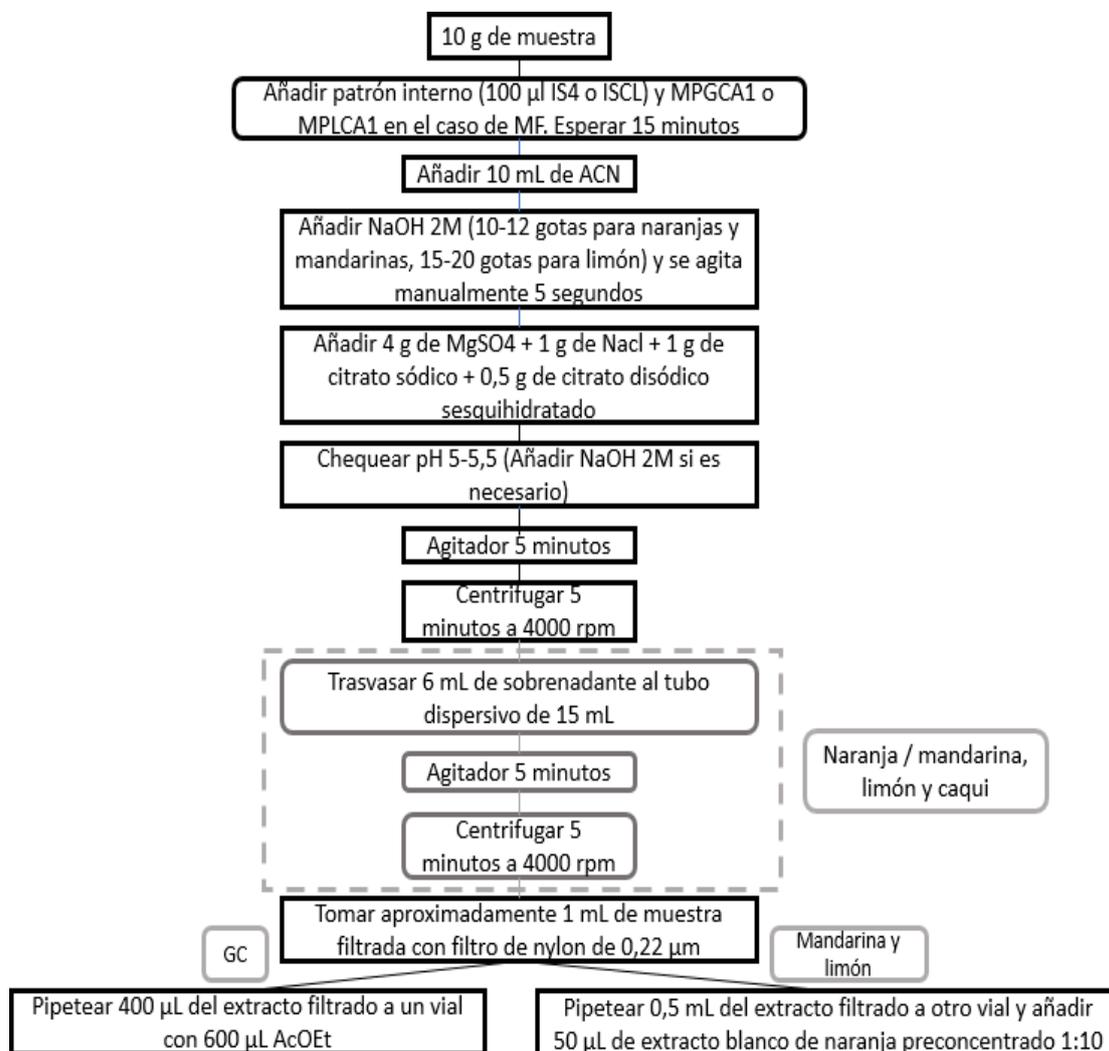
**Ecuación 2.** Cálculo del % zumo exprimido a partir de la muestra de naranja.

A continuación, se trasvasaron 2 mL del zumo a un vaso de precipitados de 50 mL y se añadieron 2 gotas de fenolftaleína, para realizar la valoración ácido-base con NaOH 0.1 M. De esta manera, se puede conocer de forma aproximada la acidez del zumo y por consiguiente de las naranjas, si se consume mucha cantidad de base, el zumo es ácido. Con estos valores, se calculó *a posteriori* el valor del índice de maduración (**IM**), que se define como el grado de madurez de una fruta (**Ecuación 3**).

$$IM = ({}^t\text{Brix} / V (\text{NaOH})) \times 3.125$$

**Ecuación 3.** Cálculo del índice de maduración a partir del contenido en azúcar de la naranja (*t*Brix) y el volumen de NaOH consumido en la valoración.

Se considera que las naranjas y mandarinas han alcanzado el debido estado de madurez cuando el IM es superior a 5.5, excepto para variedades tardías cuyo caso el valor alcanzado por dicha relación será igual o superior a 6.5.



**Figura 20.** Esquema resumen de la preparación de muestra para HPLC y GC.

### 4.8.2- *Análisis fisicoquímico de aguas*

En muestras de agua, tanto potable como de regadío, se realizó un primer análisis fisicoquímico con el pH-metro y el conductímetro. El análisis restante, consistente en las determinaciones de calcio, magnesio, sodio, nitratos, sulfatos, coliformes totales, recuento de *Escherichia Coli*, etc. Lo realiza otra empresa colaboradora.

En primer lugar, se calibró el pH-metro (4.01, 6.00 y 10.00) y el conductímetro (147, 1413 y 12880  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) con 3 medidas. Con el calibrado realizado, se pasó la muestra de agua a dos frascos transparentes ( $n=2$ ), y con ayuda de una barra magnética y una sonda se midió tanto la conductividad como el pH.

En segundo lugar, se midió el cloro libre y cloro total con un colorímetro. Para ello se llenaron 3 frascos transparentes con la muestra de agua. Uno se utilizó como blanco, otro se le añadió el reactivo para cloro libre y al tercero se le añadió el reactivo para cloro total. A continuación, se midió el blanco y luego los dos frascos con su correspondiente colorímetro. Con el resultado de ambos, se puede sacar el cloro combinado (**Ecuación 4**).

$$\text{Cloro combinado} = \text{Cloro total} - \text{Cloro libre}$$

**Ecuación 4.** *Cálculo del cloro combinado en una muestra de agua.*

### 4.9- Preparación del extracto blanco y preconcentrado de naranja

Para la preparación del extracto blanco se aplicó el procedimiento descrito en el **apartado 4.8.1**, sin añadir IS4 o ISLC10. El extracto resultante se filtró con un filtro de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$  y se almacenó en el frigorífico en una botella de 50 mL con tapón rosca y septum PFTE, etiquetado con el código de la muestra, matriz, fecha de preparación y operador.

El blanco de naranja fue utilizado para matrices como naranja, mandarina, limón y fresa. El blanco de melón para melón, sandía, melocotón y nectarina. El blanco de caqui para caqui.

- Preparación del extracto de naranja preconcentrado 1:10

Se tomaron 50 mL del extracto blanco con una probeta de 100 mL y se llevó a sequedad en el rotavapor. A continuación, se reconstituyó con 5 mL de ACN, se sonicó el balón de base redonda durante 1 minuto. El extracto resultante se filtró con filtro de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$  y se almacenó en el refrigerador en una botella ámbar de 10 mL con tapón rosca y septum PTFE, etiquetada con el nombre, fecha de preparación y el operador.

# **INVESTIGACIÓN**

## **5. Investigación**

### **5.1- Material**

- Agitador de probetas
- Balanza analítica, Mettler Toledo
- Balanza granataria, Mettler Toledo
- Bolsa hermética de plástico, Vidra Foc
- Botella de vidrio ámbar con tapón rosca de 60, 30 y 10 mL, Vidra Foc
- Centrífuga, Ortoalresa
- Congelador, Indesit
- Cronómetro, Scharlau
- Erlenmeyer de 100 y 250 mL, Vidra Foc
- Filtros de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , Agilent
- Frigorífico, LG
- Jeringuilla desechable, Henke-Sass Wolf
- Material de vidrio/metal de uso habitual en el laboratorio
- Matraz aforado de 10, 20, 50 y 100 mL, Scharlau
- Micropipetas automáticas de 1-10 mL, 10-100  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$ , Transferpette
- Pipetas Pasteur, Brand
- Puntas de plástico para diferentes micropipetas, Brand
- Septum PTFE, Agilent
- Thermomix, Vorwerk
- Tiras reactivas de pH, Macherey-Nagel
- Tubos Falcon de 15 mL, Deltalab
- Tubo Falcon de 50 mL, Teknokroma
- Tubo QuEChERS de extracción, Teknokroma
- Vaso de precipitados de 100 mL, Vidra Foc
- Viales de vidrio transparentes de 2 mL Agilent

### **5.2- Reactivos y disolventes**

- Acetato de amonio, Fluka (Suiza)
- Acetona calidad HPLC-MS, Fluka (Suiza)
- Acetonitrilo calidad HPLC-MS, PanReac (España)
- Ácido acético, Fluka (Suiza)
- Ácido fórmico, Honeywell (EEUU)
- Agua calidad HPLC-MS, Honeywell (EEUU)
- Argon gas, Praxair (EEUU)
- Formiato de amonio, Agilent (EEUU)
- Hidróxido de sodio, Panreac (España)
- Metanol calidad HPLC-MS, Honeywell (EEUU)

- Nitrógeno gas, Praxair (EEUU)
- Octadecilsilano, Agilent (EEUU)
- Tetrabutilamonio, Sigma-Aldrich (EEUU)
- Sulfato de magnesio, Panreac (España)
- Patrones empleados:
  - ✓ Plaguicidas muy polares:
    - Ácido Fosfónico, Dr Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
    - Fosetil Aluminio, Dr Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
  - ✓ Plaguicidas ácidos:
    - 2,4-D, Dr Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
    - Ácido Giberélico, Dr Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
    - Clopiralida, Dr Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
    - Diclorprop, Dr Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
    - Fluroxipir, Dr Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
    - MCPA, Dr Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
    - MCPB, Dr Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
    - Metaldehído, Dr Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
    - Triclopir, Dr Ehrenstorfer GmbH (Alemania)

### 5.3- Instrumentación

El desarrollo y validación de dos métodos multiresiduales para la determinación de plaguicidas muy polares y ácidos en cítricos se llevó a cabo mediante un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas, en concreto un triple cuadrupolo (**HPLC-QqQ**) (**Figura 21**). El cromatógrafo de líquidos es un Waters Alliance 2695 Separations Module que consiste en una bomba cuaternaria de mezcla a baja presión, un compartimento termostatzado de columna y un muestreador automático.

El espectrómetro de masas es un Micromass Quattro Micro API con una interfase ESI y un analizador de masas QqQ.



**Figura 21.** Imagen del equipo HPLC-QqQ empleado para el diseño y validación de los métodos.

#### 5.4- Preparación de soluciones patrón

- Disolución patrón 1000 mg L<sup>-1</sup> (DPATpatrón)

Se pesó en una balanza analítica de precisión ±0.1 mg, (20 ± 2.0) mg de cada patrón directamente en un aforado de 20 mL. A continuación, se enrasó con metanol con la ayuda de un vaso de precipitados de 100 mL. Luego, se agitó y sonicó durante 5 minutos y se traspasó a una botella de vidrio ámbar con tapón rosca de 30 mL.

- Plaguicidas muy polares
- Disolución patrón 10 mg L<sup>-1</sup> en Tetrabutilamonio

Se cogió un vial de 2 mL transparente y se añadió con una pipeta automática 20 µL del DPAT anterior de cada compuesto (Fosetil-Al y Ácido Fosfónico) y 20 µL de Terc-butilamonio. Para luego, acabar añadiendo 1960 µL de metanol y se sonicó.

- Plaguicidas ácidos
- Disolución patrón 10 mg L<sup>-1</sup>

Se cogió un matraz aforado de 10 mL y se añadió con una pipeta automática 100 µL de los DPAT anteriores de cada compuesto (2,4-D, Ácido giberélico, Clopiralida, Diclorprop, Fluroxipir, MCPA, MCPB, Metaldehído, Triclopir). Para luego, acabar añadiendo 1.1 mL de metanol y se sonicó.

#### 5.5- Desarrollo del método cromatográfico

##### 5.5.1- Método para plaguicidas muy polares

El objetivo es desarrollar un método que permita determinar plaguicidas muy polares (Fosetil-Al y Ácido fosfónico) hasta 50 µg Kg<sup>-1</sup> en frutas, ya que el LMR que marca la legislación europea es de 75 mg Kg<sup>-1</sup>. Debido a futuros cambios en la legislación, se prefiere alcanzar un límite de cuantificación (LOQ) más bajo.

- Infusionar

Con el fin de obtener una disolución patrón de 10 mg L<sup>-1</sup>, en un vial se pipetearon 10 µL de la disolución patrón de 1000 mg L<sup>-1</sup> de Fosetil-Al (o Ácido fosfónico) y 990 µL de MeOH.

Para infusionar en el equipo, se inyectó directamente en el espectrómetro de masas con una jeringa de 10 µL. A continuación, con el programa MassLynx se obtuvo el ion precursor y dos iones producto tanto para el Fosetil-Al como para el Ácido fosfónico (**Figuras AI y AII**). Además, se optimizó la energía del cono y de colisión, seleccionando el valor que generaba mayor sensibilidad en los picos (mayor intensidad). Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 4**.

**Tabla 4.** Tabla resumen de la infusión de los plaguicidas muy polares con las dos transiciones seleccionadas. Nota: La transición 1 es la de cuantificación (más sensible) y la transición 2 es la de confirmación (menos sensible). (Ec, energía de colisión).

Compuestos	Transición 1, Ec (eV), Cono (V)	Transición 2, Ec (eV), Cono (V)
Fosetil-Al (ESI-)	109.0 > 81.0, 10, 20	109.0 > 63.0, 20, 20
Ácido fosfónico (ESI-)	81.0 > 79.0, 15, 33	81.0 > 63.0, 25, 33

- Método cromatográfico

Una vez seleccionadas las transiciones, se desarrolló un método de monitorización de reacción múltiple (**MRM**, del inglés *Multiple Reaction Monitoring*). Con el método ya elaborado, se procedió a inyectar en la columna Atlantis T3 C<sub>18</sub> 100 Å 2.1x100 mm, 3 µm termostatizada a 40°C los dos compuestos a 1 mg L<sup>-1</sup> en diferentes concentraciones (25 mM y 2.5 mM) de TBA (**Figura AIII**).

Para la separación cromatográfica se usó un gradiente en fase reversa consistente en la mezcla variable de una fase acuosa (A) que comprendía el agua y una fase orgánica (B) que contenía acetonitrilo (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Primer gradiente empleado para la separación cromatográfica de los plaguicidas muy polares con acetonitrilo.

Tiempo	%B
0.00	2
3.00	2
3.10	60
7.00	60
7.10	2
11.00	2

Los resultados mostraron que a mayor cantidad de TBA, mayor sensibilidad e intensidad del Fosetil-Al, pero sucedía lo contrario para el Ácido fosfónico. Por lo tanto, como el Ácido fosfónico era menos sensible que el Fosetil-Al (menor intensidad) se estableció un compromiso entre los dos compuestos y se optimizó la concentración de TBA a 2.5 mM.

A continuación, se procedió a añadir 2.5 mM de TBA a cada compuesto de 1 mg L<sup>-1</sup> y se comprobó que lo anteriormente planteado era cierto. Los resultados de esta prueba se muestran las **figuras AIV** y **AV**.

Los picos cromatográficos eran adecuados y salían a tiempos cortos. Además, el área del pico para el Fosetil-Al tenía un valor grande, pero no era así para el Ácido fosfónico. Por lo que se procedió a realizar otra prueba con un mix de los dos compuestos a 1 mg L<sup>-1</sup> en agua (**Figura AVI**).

En los cromatogramas no se encontraron los compuestos debido a que la relación señal/ruido (**S/N**) era baja. Por lo tanto, se cambió el gradiente para mejorar la sensibilidad (**Tabla 6**) y se preparó otro mix a 1 mg L<sup>-1</sup> de Fosetil-Al y 10 mg L<sup>-1</sup> de Ácido fosfónico, porque se pensó que los compuestos se podían haber degradado (**Figura AVII**).

Se observó que los compuestos volvían a salir y se mejoró la sensibilidad, llegando a obtener áreas de 117774 para el Fosetil-Al y 761719 para el Ácido fosfónico. Con esto, se decidió diluir el mix x10 (**Figura AVIII**).

**Tabla 6.** Segundo gradiente empleado para la separación cromatográfica de los plaguicidas muy polares con acetonitrilo.

Tiempo	%B
0.00	5
1.20	15
2.00	15
2.10	60
7.00	60
7.10	5
11.00	5

Las pruebas mostraron una pérdida en la sensibilidad del método obteniendo áreas de 5916 en el caso de Fosetil-Al y 4277 para el Ácido fosfónico. Pero para llegar a establecer un método para determinar estos contaminantes a  $50 \mu\text{g Kg}^{-1}$  se necesitaba mejorar más la sensibilidad, por lo que se probó añadiendo Ácido fórmico en la fase móvil (A), en tres porcentajes diferentes: 0.5, 0.1 y 0.01% (**Figuras AIX, AX y AXI**).

En base a los resultados, se escogió el 0.1 % de Ácido fórmico en la fase móvil, ya que aumentaba la sensibilidad. Así las áreas fueron de: 4118 (0.5 % Ácido fórmico), 8469 (0.1 % Ácido fórmico) y 9394 (0.01 % Ácido fórmico) para el Fosetil-Al, luego áreas de 20141 (0.5 % Ácido fórmico), 31909 (0.1 % Ácido fórmico) y 25307 (0.01 % Ácido fórmico) para el Ácido fosfónico. Por lo tanto, esos valores de las áreas nos confirmaban que se podría diluir x10 (**Figura AXII**).

La sensibilidad disminuyó sustancialmente como demuestran sus áreas: 646 (Fosetil-Al) y 1453 (Ácido fosfónico), lógico debido a que se diluyó, pero disminuyó sustancialmente para el Ácido fosfónico. Por esto, se decidió cambiar el disolvente orgánico y emplear metanol, además de usar otro gradiente más suave (**Tabla 7**). Esto se probó con una disolución de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  (**Figura AXIII**). Pero con este cromatograma se observó que con este método no éramos capaces de conseguir ver el Fosetil-Al a  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ .

**Tabla 7.** Gradiente empleado para la separación cromatográfica de los plaguicidas muy polares con metanol.

Tiempo	%B
0.00	2
1.30	2
3.00	15
3.10	60
7.00	60
7.10	2
11.00	2

En las pruebas se observó que la sensibilidad aumentó para los dos compuestos: 15546 (Fosetil-Al) y 3398 (Ácido fosfónico), pero la S/N disminuyó. Por lo que, aún se necesitó aumentar más para llegar al objetivo de  $50 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . A continuación, se probó a inyectar los dos compuestos a  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  añadiendo diferentes concentraciones de TBA en la fase móvil: 0.5 mM, 0.25 mM y 0.06 mM (**Figuras AXIV, AXV y AXVI**).

Los compuestos mejoraron en sensibilidad: 45271 (Fosetil-Al) y 16892 (Ácido fosfónico), además de la forma de pico al trabajar con 0.06 mM de TBA en la fase móvil. Como demuestran sus áreas, se puede seguir diluyendo 10 veces más para llegar a un LOQ más bajo. En este caso, se trató de llegar a  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  (**Figura AXVII**).

En esta prueba, disminuyó la S/N en los dos compuestos, pero fue más evidente en el Ácido fosfónico, por lo que se decidió establecer el límite en  $50 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .

El método desarrollado se decidió probar en muestras blanco de naranja y fortificadas a tres niveles: 5, 50 y  $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .

- Preparación de muestras fortificadas

La preparación de muestra se basa en el método de extracción *Quick Polar Pesticides (QuPPE)*.

La muestra blanco de naranja se trituró y homogeneizó con una Thermomix. El triturado, se pasó a una bolsa hermética de plástico debidamente etiquetada. A continuación, se pesó en un tubo Falcon de 50 mL ( $10.00 \pm 0.1$ ) g de muestra. Luego, se pipetearon  $50 \mu\text{L}$  del mix a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , en el caso de trabajar con el fortificado a  $0.050 \text{ mg/Kg}$ ,  $500 \mu\text{L}$  del mismo mix para el fortificado a  $0.500 \text{ mg/Kg}$  y  $50 \mu\text{L}$  de cada uno de los patrones a  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  para el fortificado a  $5 \text{ mg/Kg}$ . Se dejó en contacto 15 minutos.

Al finalizar el tiempo, se añadió agua a los 3 fortificados (1.45 mL en el fortificado a  $0.050 \text{ g/Kg}$ , 1 mL en el fortificado a  $0.500 \text{ g/Kg}$  y 1.4 mL en el fortificado a  $5 \text{ g/Kg}$ ), además de 10 mL de MeOH acidificado al 1% de ácido fórmico con agitación manual de 5 segundos. Después, se agitó durante 5 minutos en el agitador de probetas y se centrifugó durante otros 5 minutos a 4000 rpm. Para finalizar, con una jeringa se tomó 3 mL de extracto del tubo Falcon y se pasó por un filtro de nylon de  $0.22 \mu\text{m}$  directamente al vial correspondiente con el código de identificación.

- Aplicación del método a muestras fortificadas

Los resultados para el blanco y los fortificados a 5, 50 y  $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$  se muestran en las **figuras AXVIII, AXIX, AXX y AXXI**, respectivamente.

El blanco de muestra nos mostró que no contenía ninguno de los dos compuestos a determinar, pero en las muestras fortificadas se observó una banda ancha de baja sensibilidad y baja S/N con el método elaborado con anterioridad. Por lo tanto, se decidió diluir x2 y x5 los extractos de los fortificados a 50 y  $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , con el fin de mejorar la relación S/N (**Figuras AXXII, AXXIII, AXXIV y AXXV**).

En las diluciones x2 y x5 a  $50 \mu\text{g Kg}^{-1}$  se pudo apreciar que mejoraba la separación, pero la relación S/N era baja y sobre todo para el Ácido fosfónico. En cambio, en el fortificado a  $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$  diluido x2 se mejoró la sensibilidad y las áreas: 10702 (Fosetil-Al) y 1436 (Ácido fosfónico), por lo que nos indicaron que se podía diluir más, pero necesitábamos llegar a un LOQ más bajo.

Entonces, al ver el fortificado a  $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$  diluido x5 se pudo apreciar que se mejoró la sensibilidad y la relación S/N como demostraron sus áreas: 6118 (Fosetil-Al) y 539 (Ácido

fosfónico), pero también nos indicaba que no éramos capaces de diluir más nuestra muestra. Por lo que, se cambió el disolvente orgánico y se probó con 2-propanol, ya que tenía mayor poder de elución y podría hacer que los picos saliesen más eficaces (**Figura AXXVI**). Para ello, también se modificó el gradiente (**Tabla 8**).

**Tabla 8.** Gradiente empleado para la separación cromatográfica de los plaguicidas muy polares con 2-propanol.

Tiempo	%B
0.00	2
1.30	2
3.00	15
3.10	60
7.00	60
7.10	2
11.00	2

Los resultados obtenidos al emplear el 2-propanol fueron significativamente mejores que los anteriores, por mejorar la sensibilidad y la forma de pico de los dos compuestos (aunque para el Ácido fosfónico no fue suficiente). Las áreas fueron de: 6033 (Fosetil-Al) y 1717 (Ácido fosfónico), con lo que se demostró que no era suficiente esa mejora de la sensibilidad y no seríamos capaces de ver los compuestos a 50 µg Kg<sup>-1</sup>. Por lo tanto, este método quedó a la espera de seguir haciendo pruebas.

### 5.5.2- Método para plaguicidas ácidos

El objetivo es desarrollar un método que permita determinar 9 plaguicidas ácidos (2,4-D, Ácido Giberélico, Clopiralida, Diclorprop, Fluroxipir, MCPA, MCPB, Metaldehído, Triclopir), de forma simultánea y que permita llegar a un LOQ de 10 µg Kg<sup>-1</sup> en frutas.

- Infusionar

En un vial se pipetearon 10 µL de la disolución DPAT patrón de 1000 mg L<sup>-1</sup> de cada uno de los plaguicidas ácidos y 990 µL de MeOH con la pipeta automática, con el fin de obtener una disolución patrón de 10 mg L<sup>-1</sup> e infusionar en el equipo. Los resultados obtenidos de la infusión se muestran en la **tabla 9**.

- Método cromatográfico

Con las transiciones se desarrolla un método **MRM**. Con el método ya creado, se procedió a inyectar en la columna Atlantis T3 C<sub>18</sub> 100 Å 2.1x100 mm, 3 µm termostatizada a 40°C los 9 compuestos a 10 y 100 µg L<sup>-1</sup> (**Figuras AXXVII, AXXVIII, AXXIX y AXXX**).

Para la separación cromatográfica se usó un gradiente (**Tabla 10**) en fase reversa consistente en la mezcla variable de una fase acuosa (A) que contenía agua al 0.01% de ácido acético con 2 mM de acetato amónico y una fase orgánica (B) que contenía metanol al 0.01% de ácido acético con 2 mM de acetato amónico.

**Tabla 9.** *Tabla resumen de los plaguicidas ácidos con las dos transiciones.* Nota: El Metaldehído al ser un heterociclo con oxígenos se compleja con el amonio de la fase móvil.

Compuestos	Transición 1, Ec (eV), Cono (V)	Transición 2, Ec (eV), Cono (V)
2,4-D (ESI-)	218.4 > 161.0, 15, 20	218.9.0 > 124.9, 30, 20
Ácido giberélico (ESI-)	345.0 > 239.2, 15, 39	345.0 > 143.0, 25, 39
Clopiralida (ESI+)	191.9 > 146.0, 20, 12	191.9 > 110.0, 25, 12
Diclorprop (ESI-)	223.1 > 161.2, 15, 20	233.1 > 125.1, 30, 20
Fluroxipir (ESI-)	253.0 > 195.1, 15, 16	253.0 > 233.0, 5, 16
MCPA (ESI-)	199.0 > 141.1, 15, 22	199.0 > 105.0, 30, 22
MCPB (ESI-)	227.1 > 141.0, 15, 20	227.1 > 105.0, 45, 20
Metaldehído (ESI+)	194.0 > 106.0, 5, 30	194.0 > 62.0, 5, 30
Triclopir (ESI-)	253.9 > 196.0, 15, 20	253.9 > 218.0, 15, 20

**Tabla 10.** *Gradiente empleado para la separación cromatográfica de los plaguicidas ácidos.*

Tiempo	%B
0.00	0
5.00	100
15.00	100
15.01	0

Los resultados demostraron que la sensibilidad fue alta para  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  pero disminuía de forma incomprensible a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Además, los compuestos analizados en polaridad positiva (Metaldehído y Clopiralida) se determinaron con una baja S/N. Por lo tanto, se volvieron a inyectar los mix a  $10$  y  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  tratando de mejorar la sensibilidad cambiando el gradiente (Tabla 11) y volviéndolos a infundir a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  utilizando como disolvente la fase móvil B (Tabla 12), estas pruebas se encuentran en las figuras AXXXI, AXXXII, AXXXIII y AXXXIV.

**Tabla 11.** *Segundo gradiente empleado para la separación cromatográfica de los plaguicidas ácidos.*

Tiempo	%B
0.00	5
5.00	95
15.00	95
15.01	5

**Tabla 12.** Tabla resumen de la infusión de los plaguicidas ácidos optimizados con la fase móvil.

Compuestos	Transición 1, Ec (eV), Cono (V)	Transición 2, Ec (eV), Cono (V)
<b>2,4-D (ESI-)</b>	218.4 > 161.0, 15, 20	218.9.0 > 124.9, 30, 20
<b>Ácido giberélico (ESI-)</b>	345.0 > 239.2, 15, 39	345.0 > 143.0, 25, 39
<b>Clopiralida (ESI+)</b>	191.9 > 146.0, 20, 21	191.9 > 110.0, 25, 21
<b>Diclorprop (ESI-)</b>	223.1 > 161.2, 15, 16	233.1 > 125.1, 30, 16
<b>Fluroxipir (ESI-)</b>	253.0 > 195.1, 15, 15	253.0 > 233.0, 5, 15
<b>MCPA (ESI-)</b>	199.0 > 141.1, 15, 22	199.0 > 105.0, 30, 22
<b>MCPB (ESI-)</b>	227.1 > 141.0, 15, 22	227.1 > 105.0, 45, 22
<b>Metaldehído (ESI+)</b>	194.0 > 106.0, 5, 10	194.0 > 62.0, 5, 10
<b>Triclopir (ESI-)</b>	253.9 > 196.0, 15, 20	253.9 > 218.0, 15, 20

En esta prueba se observó que los compuestos al infundirlos con la fase móvil variaron las energías de cono debido a los contraiones presentes en dicha fase. Además, la sensibilidad aumentó a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , tanto para la ionización en positivo como en negativo. En cambio, a  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  mejoró para los compuestos con ionización positiva como el Metaldehído, pero no tanto para la Clopiralida (pico doble), además disminuyó el área para la ionización negativa de dos compuestos: Ácido giberélico y Triclopir.

Con estos resultados, se decidió probar en muestras fortificadas a 10 y  $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .

- Preparación de muestras fortificadas

La preparación de muestra se basa en el método de extracción en fase sólida dispersiva (QuEChERS).

Se aplicó el procedimiento descrito en el apartado 4.8.1, sin añadir ISLC10. El extracto resultante se filtró con un filtro de nylon de  $0.22 \mu\text{m}$  directamente al vial correspondiente.

- Aplicación del método a muestras fortificadas

Los resultados para las muestras fortificadas a 10 y  $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$  se muestran en las figuras AXXXV, AXXXVI, AXXXVII y AXXXVIII.

En dichas pruebas se observó que a  $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$  los compuestos presentaron una buena sensibilidad como demostraron sus áreas, excepto la Clopiralida que es una banda. En cambio, a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  los compuestos en polaridad negativa fueron eficaces, pero las áreas fueron pequeñas para tres de ellos: Ácido Giberélico, Triclopir y Fluroxipir. En polaridad negativa, la sensibilidad fue baja tanto para el Metaldehído (área pequeña) como para la Clopiralida (banda), pero la transición del metaldehído era selectiva. Para mejorar la sensibilidad en el fortificado a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , se trató de inyectar más volumen de muestra y se probó con 20, 30 y  $40 \mu\text{L}$  (Figuras AXXXIX, AXXXX, AXXXXI, AXXXXII, AXXXXIII y AXXXXIV).

A la vista de los resultados, se comprobó que a mayor volumen de inyección disminuía la sensibilidad y la S/N. Debido a esto, se decidió quedarse con el volumen de inyección empleado en las primeras muestras fortificadas que era de  $10 \mu\text{L}$ .

A continuación, se decidió probar en el fortificado a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  una mayor cantidad de ácido acético en la fase móvil, en concreto un 0.1 % y empleando el mismo gradiente, con el objetivo de mejorar la sensibilidad de la Clopiralida (**Figuras AXXXXV y AXXXXVI**).

En las pruebas se observó que la sensibilidad aumentó sustancialmente para todos los compuestos como demostraron sus áreas. Además, para la Clopiralida se visualizó un pico en la transición de cuantificación. Pero no fue así para la transición de confirmación del MCPB ( $227.1 > 105.0$ ) (**Figura AXXXXVII**) y se decidió volver a infundir una disolución patrón a  $10 \text{mg L}^{-1}$  en *daughter scan*, para ver si el fragmento lo generaba el ion producto (141.1) en vez del ion precursor. Esto último fue lo que pasó, el fragmento a 105.0 lo generaba el ion producto y se modificó en el método MRM. Por último, se volvió a inyectar el fortificado a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en las mismas condiciones anteriores para comprobar este cambio (**Figuras AXXXXVIII y AXXXXIX**).

Los resultados que se observaron en la prueba fueron exitosos para la transición de confirmación del MCPB, ya que salió un pico de baja sensibilidad, pero mayor S/N. En cambio, para la Clopiralida y las transiciones de confirmación del Ácido giberélico y Triclopir tenían una baja S/N y muy poca sensibilidad. Por lo tanto, se decidió volver a infundirlos otra vez en el equipo y obtener otra transición más sensible o selectiva.

En el caso del Triclopir se obtuvieron los mismos resultados, pero como su estructura contiene cloros, se obtuvo la misma transición del isótopo con  $\text{Cl}^{37}$  del ion molecular. En cambio, para el Ácido giberélico como se volvieron a obtener los mismos resultados se probó a infundirlo en ionización positiva, ya que sabiendo su pKa (4) y que el pH de la fase móvil (2) lo mantendría protonado, incluso se podría amoniar con dicha fase. A la vista de los resultados, se comprobó que se amoniaba con la fase móvil y se consiguieron optimizar dos transiciones. Por último, en la Clopiralida se decidió continuar con el método de los 8 plaguicidas restantes, ya que sus transiciones son muy poco selectivas y muy ruidosas. El nuevo método de MRM se muestra en la **tabla 13**.

**Tabla 13.** Tabla resumen de la infusión de los plaguicidas ácidos optimizados con la fase móvil. Nota: El Ácido giberélico se compleja con el amonio de la fase móvil.

Compuestos	Transición 1, Ec (eV), Cono (V)	Transición 2, Ec (eV), Cono (V)
2,4-D (ESI-)	218.4 > 161.0, 15, 20	218.9.0 > 124.9, 30, 20
Ácido giberélico (ESI+)	364.0 > 329.2, 10, 15	364.0 > 239.0, 15, 15
Clopiralida (ESI+)	191.9 > 146.0, 20, 21	191.9 > 110.0, 25, 21
Diclorprop (ESI-)	223.1 > 161.2, 15, 16	233.1 > 125.1, 30, 16
Fluroxipir (ESI-)	253.0 > 195.1, 15, 15	253.0 > 233.0, 5, 15
MCPA (ESI-)	199.0 > 141.1, 15, 22	199.0 > 105.0, 30, 22
MCPB (ESI-)	227.1 > 141.0, 15, 22	141.1 > 105.0, 22, 20
Metaldehído (ESI+)	194.0 > 106.0, 5, 10	194.0 > 62.0, 5, 10
Triclopir (ESI-)	255.9 > 198.0, 15, 20	253.9 > 196.0, 15, 20

A continuación, se volvió a inyectar el fortificado a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  con el nuevo método elaborado (**Figuras AL y ALI**).

En estas pruebas se observó que los compuestos modificados con anterioridad mejoraron en sensibilidad (demasiado para la transición de cuantificación del Ácido giberélico debido a que es una hormona que secretan las plantas de forma natural). Los demás compuestos continuaron con una sensibilidad muy similar a la obtenida en las **figuras AXXXXVIII y AXXXXIX**. Con estos resultados se elaboró una recta de calibrado utilizando el método del patrón interno (Trifenilfosfato, TPP) para corregir el efecto matriz y los errores con respecto a la extracción. Además, se volvieron a preparar dos muestras fortificadas a 10 y 100  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de ISLC10.

- Recta de calibrado

La recta de calibrado se elaboró con 5 puntos (S0 a S4) como se describe en la **tabla 2**, dentro del **apartado 4.6**.

- Cuantificación

En primer lugar, se infundió el TPP a 10  $\text{mg L}^{-1}$  en el equipo y los resultados se muestran en la **tabla 14**.

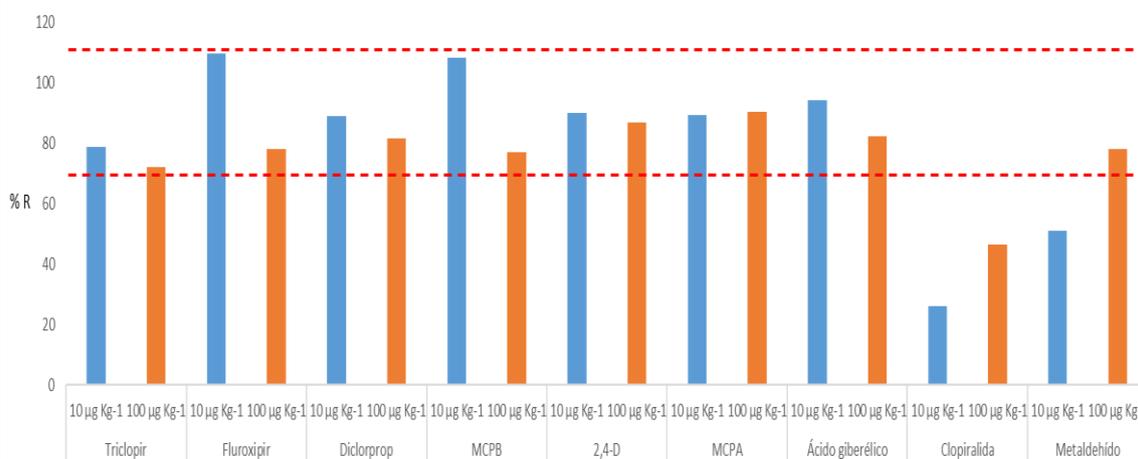
**Tabla 14.** *Tabla resumen de la infusión del patrón interno.*

Compuestos	Transición 1, Ec (eV), Cono (V)
TPP (ESI+)	327.2 > 152.0, 30, 45

A continuación, se elaboró el método de cuantificación para los 9 plaguicidas y el patrón interno, en el cual se cogieron los resultados de la **tabla 13** y **tabla 14** para su realización.

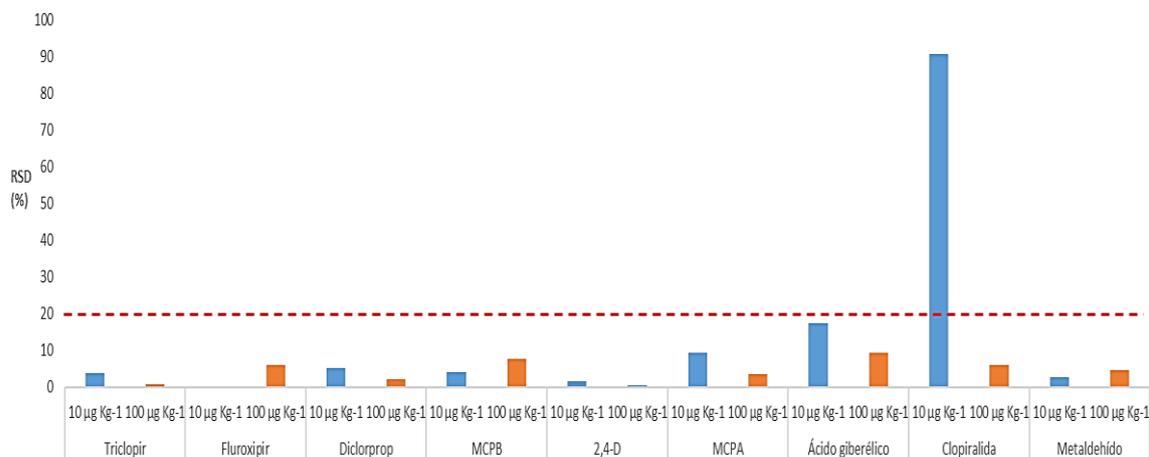
Con el método de cuantificación ya elaborado, se procedió a inyectar la recta de calibrado y dos muestras fortificadas por duplicado (**Figuras ALII, ALIII, ALIV, ALV, ALVI, ALVII, ALVIII, ALIX, ALX y ALXI**).

El criterio de aceptación para un método se establece cuando la recuperación se encuentra entre un 70-110 % y un RSD < 20 %. Por lo tanto, con los resultados de la cuantificación se calculó la media de las recuperaciones para cada uno de los compuestos y se comprobó que entraran dentro del límite estipulado (**Figura 22**).



**Figura 22.** *Gráfica resumen de las recuperaciones medias para los plaguicidas ácidos a 10 y 100  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ . Nota: Las barras azules son los compuestos a 10  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  y las barras naranjas son los compuestos a 100  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ .*

Todos los compuestos a excepción de la Clopiralida y Metaldehído ( $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) se encontraron dentro del intervalo de aceptación. Por lo que se necesitó evaluar el RSD del método (**Figura 23**)



**Figura 23.** Gráfica resumen del RSD para los plaguicidas ácidos a  $10$  y  $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . Nota: Las barras azules son los compuestos a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  y las barras naranjas son los compuestos a  $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .

El RSD calculado para los 9 compuestos fue inferior al 20 %, pero no fue así para la Clopiralida. A modo resumen, el método quedó establecido para la determinación de 8 plaguicidas ácidos, ya que la Clopiralida tenía una baja sensibilidad (una banda) y no entró dentro de los límites para aceptarla. En cambio, los demás cumplieron el criterio de aceptación, a excepción de la muestra fortificada a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  del Metaldehído. Con esta información se estableció el LOQ que es el punto de menor concentración de la recta de calibrado que puede ser determinado con certeza estadística razonable. Entonces, en el método desarrollado fue de  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  para el Triclopir, Fluroxipir, Diclorprop, MCPB, 2,4-D, MCPA y Ácido giberélico.  $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$  para el Metaldehído y no se pudo establecer para la Clopiralida.

Además, se calculó el LOD que es la menor cantidad de analito que puede ser medido con una certeza estadística razonable. Los resultados del LOD, además del LOQ para cada compuesto se muestran en la **tabla 15**.

**Tabla 15.** Tabla resumen con el LOD y LOQ calculado para los 8 plaguicidas ácidos desarrollados en el método.

Compuestos	LOD ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )
<b>Triclopir</b>	0.16	10
<b>Fluroxipir</b>	0.75	10
<b>Diclorprop</b>	0.60	10
<b>MCPB</b>	1.05	10
<b>2,4-D</b>	0.40	10
<b>MCPA</b>	0.75	10
<b>Ácido giberélico</b>	4.50	10
<b>Metaldehído</b>	1.15	100

## **CONCLUSIONES**

### 6. Conclusiones

Se han desarrollado y optimizado dos métodos multiresiduo para análisis de plaguicidas muy polares y ácidos en cítricos. Para ello se empleó la cromatografía líquida en fase reversa y uso de pares iónicos acoplada a la espectrometría de masas en tándem.

Las conclusiones extraídas de este proyecto son las siguientes:

- La técnica HPLC-MS/MS (QqQ) es de las preferidas para la detección de plaguicidas muy polares y ácidos presentes en cítricos. Esto es debido a la excelente sensibilidad y selectividad al trabajar en el modo *Selected Reaction Monitoring (SRM)*.
- Las columnas en fase reversa son adecuadas para detectar los plaguicidas ácidos. En cambio, para los muy polares se necesita de un reactivo formador de pares iónico para conseguir separarlos en la columna cromatográfica.
- Las muestras de cítricos contienen estos compuestos perjudiciales para la salud. Por lo tanto, se necesitan monitorizar.

Además, se realizó una inmersión en el laboratorio preparando muestras para el cromatógrafo de líquidos y gases ambos acoplados a la espectrometría de masas en tándem, obteniendo unas cualidades en este aprendizaje como las que se muestran a continuación:

- Organización y planificación del trabajo en el laboratorio
- Resolución de problemas analíticos dentro del laboratorio.
- Familiarizarse con el mundo de la empresa.

# **BIBLIOGRAFÍA**

## **7. Bibliografía**

- [1] <https://www.labser.es> (Fecha de acceso: 20/04/2018)
- [2] <https://www.ozeano.net/es/pesticidas-en-frutas-y-verduras> (Fecha de acceso: 28/04/2018)
- [3] Ramírez, L. (2009). Determinación de pesticidas en vegetales mediante cromatografía de gases-espectrometría de masa/masa (GC-MS/MS) (tesis doctoral). Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca, México
- [4] Subdirección General de Medios de Producción Agrícolas. (2004). *LIMITES MAXIMOS DE RESIDUOS DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS*. Madrid, **6**, 1-38
- [5] De Prada, C. (2014). Pesticidas en frutas y verduras. *OCU-Compra Maestra*, **395**, 28-31
- [6] <http://www.edafologia.net/conta/tema13/clasif.htm> (Fecha de acceso: 21/04/2018)
- [7] ESPAÑA. 2016. Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre. *Boletín Oficial del Estado*. 20 de febrero de 2016, **223**, 1-42
- [8] Gismera, M. J., et al. (2009). *Introducción a la cromatografía líquida de alta resolución*. 1ª ed. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid. Cuadernos de Apoyo, **28**. ISBN 9788483441459 8483441454
- [9] Durán, R. (2000). Análisis y efectos neuroquímicos del ácido domoico (tesis doctoral). Universidad de Vigo, Pontevedra, España
- [10] Olsen, A., et al. (2012). *Hydrophilic Interaction Chromatography: A Guide for Practitioners*. 1ª ed. New York: John Wiley & Sons. ISBN 9781118054178
- [11] [http://www.waters.com/waters/home.htm?locale=en\\_US](http://www.waters.com/waters/home.htm?locale=en_US) (Fecha de acceso: 14/05/2018)
- [12] McCallum, J., et al. (2007). Improved high performance liquid chromatographic separation of anthocyanin compounds from grapes using a novel mixed-mode ion-exchange reversed-phase column. *Journal of Chromatography A*. **1148**, 38-45
- [13] Adams, P. (2017) *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. 5ª ed. Texas: Texensis Publishing. ISBN 9781932633214
- [14] Pirsá, S., et al. (2016). Determination of Dimethylsulfoxide in Water by Capillary Gas Chromatography-Gas Sensor Based on Nanostructure Conducting Polypyrrole. *Nanoscience & Nanotechnology-Asia*, **6**, 105-112.
- [15] Watson, J., et al. (2007). *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation*. 4ª ed. Wiltshire: Wiley. ISBN 9780470516348
- [16] <http://blog.cromlab.es/tecnicas-de-inyeccion-en-hrgc-seleccione-el-inserto-adeecuado> (Fecha de acceso: 03/05/2018)
- [17] Wilson, I. (2011). High-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS)-based drug metabolite profiling. *Metabolic Profiling*, 173-190
- [18] Barceló, D. (1996). *Applications of LC-MS in environmental chemistry*. 1ª ed. Amsterdam; New York: Elsevier. ISBN 9780444820679

- [19] Saavedra, W., et al. (2015). Analytical techniques used in food metabolomics. *Agroindustrial science*. **1**, 191-210
- [20] Syage, J., et al. (2008). Atmospheric Pressure Photoionization. *LCGC North America*. **26**, 286-296
- [21] Abián, J., et al. (2008). Introducción a la Espectrometría de masas para la caracterización de Péptidos y proteínas en Proteómica. *Proteómica*, **2**, 16-35.
- [22] Thomson, J. (1921). Rays of positive electricity and their application to chemical analyses. *Longmans, Green and Company*. **42**, 174-1035
- [23] [http://www.waters.com/waters/en\\_US/MS---Mass-Spectrometry](http://www.waters.com/waters/en_US/MS---Mass-Spectrometry) (*Fecha de acceso: 25/04/2018*)

**ANEXO**

## 8. Anexo

Figura AI. Espectro de masas resultado de la infusión del Fosetil-Al a 10 mg L<sup>-1</sup>.

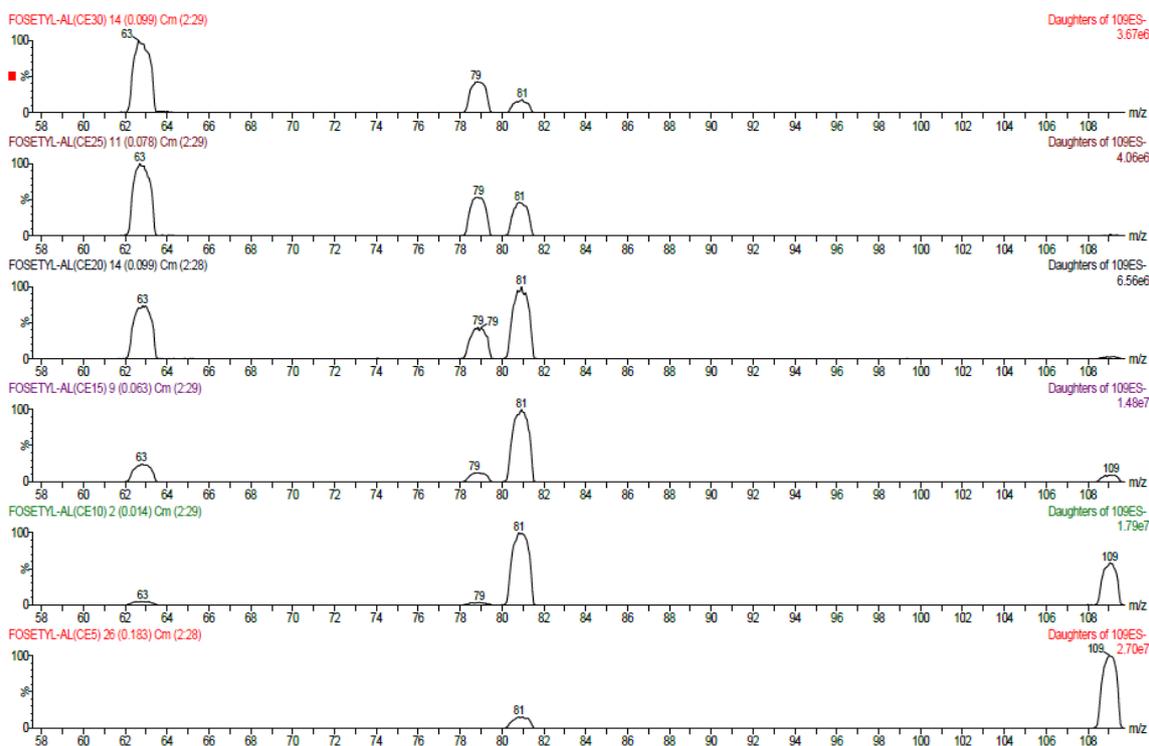
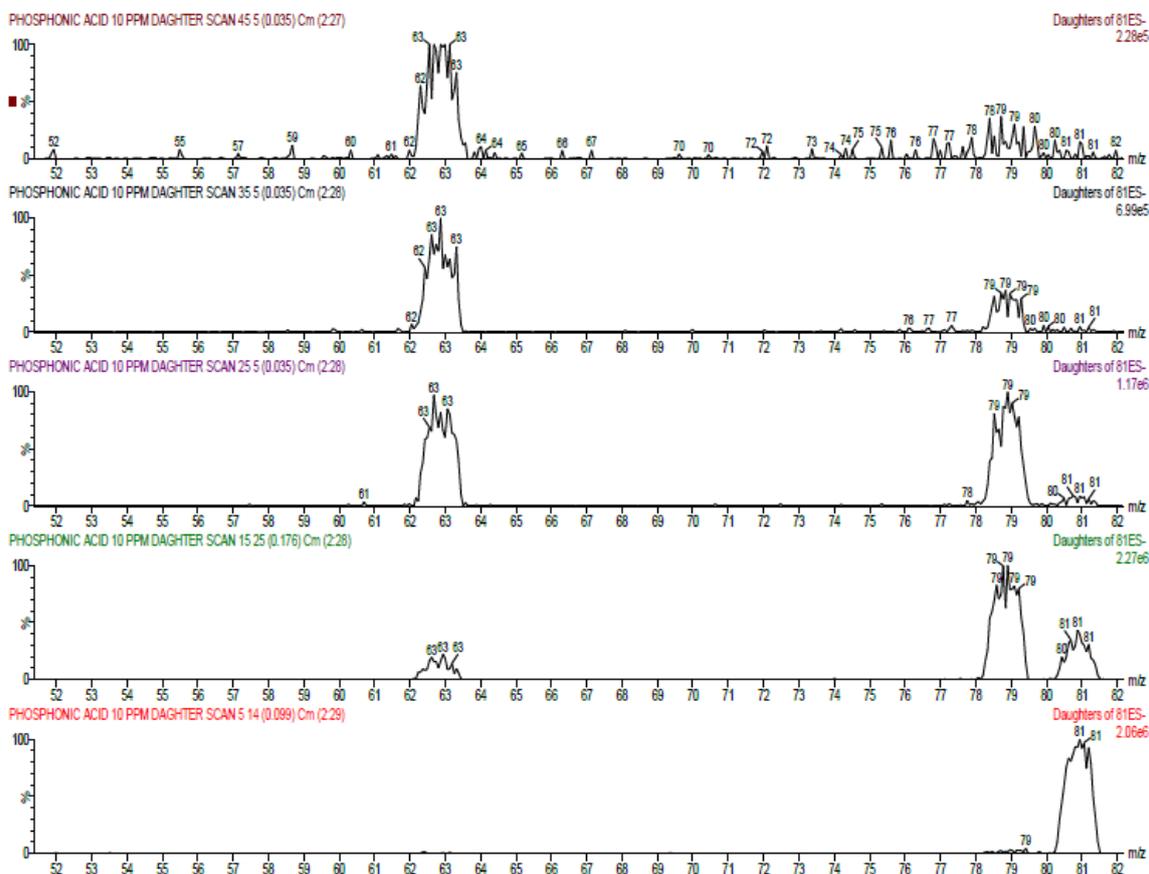
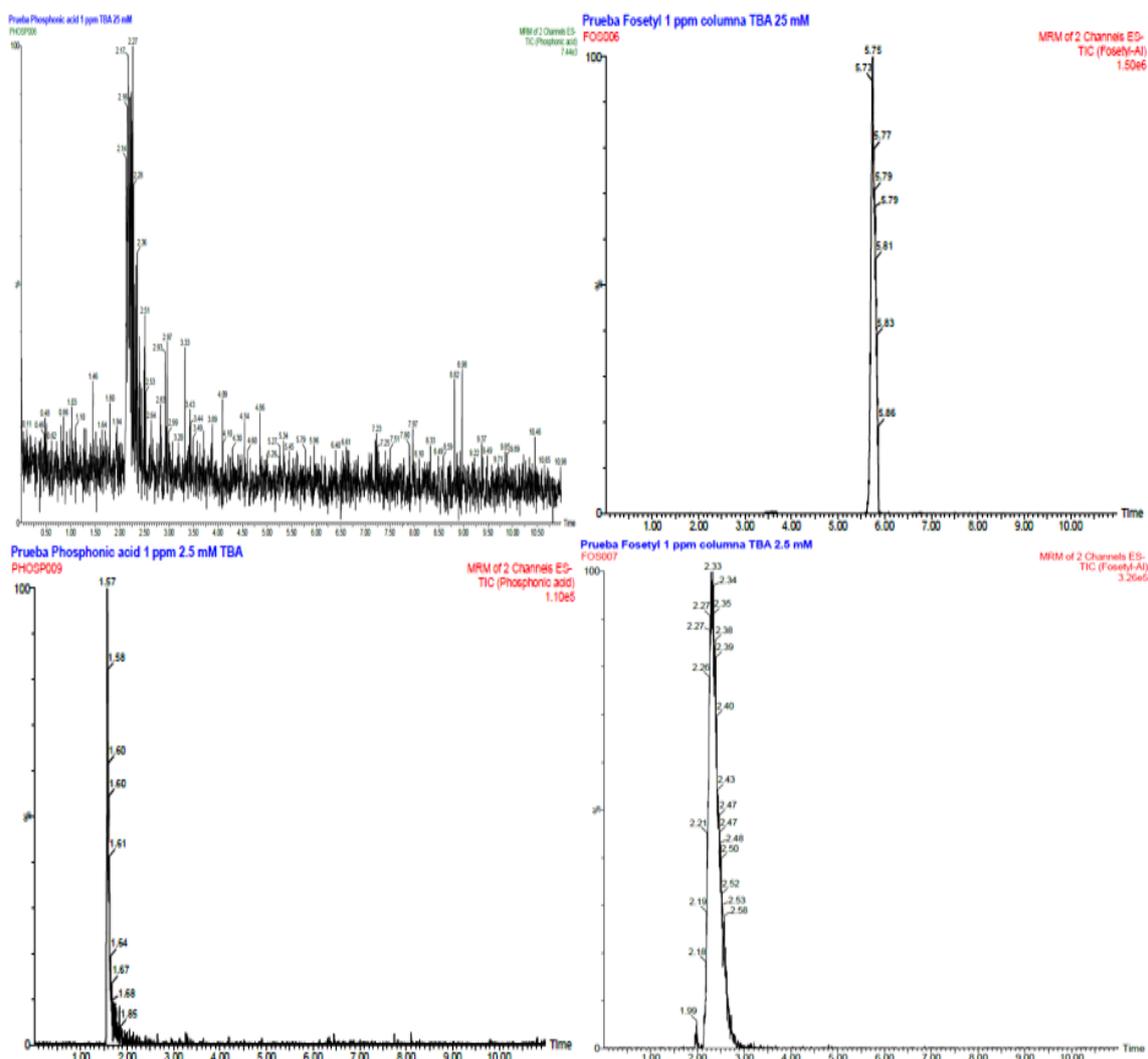


Figura AII. Espectro de masas resultado de la infusión del Ácido fosfónico a 10 mg L<sup>-1</sup>.



**Figura AIII.** Cromatogramas resultado de las pruebas con TBA en el vial, a la izquierda se encuentran los cromatogramas del Ácido fosfónico ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) en 25 mM (arriba) y 2.5 mM de TBA (abajo). A la derecha se encuentran los cromatogramas del Fosetil-Al ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) en 25 mM (arriba) y 2.5 mM de TBA (abajo).



**Figura AIV.** Cromatograma TIC obtenido para el Fosetil-Aluminio ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ).

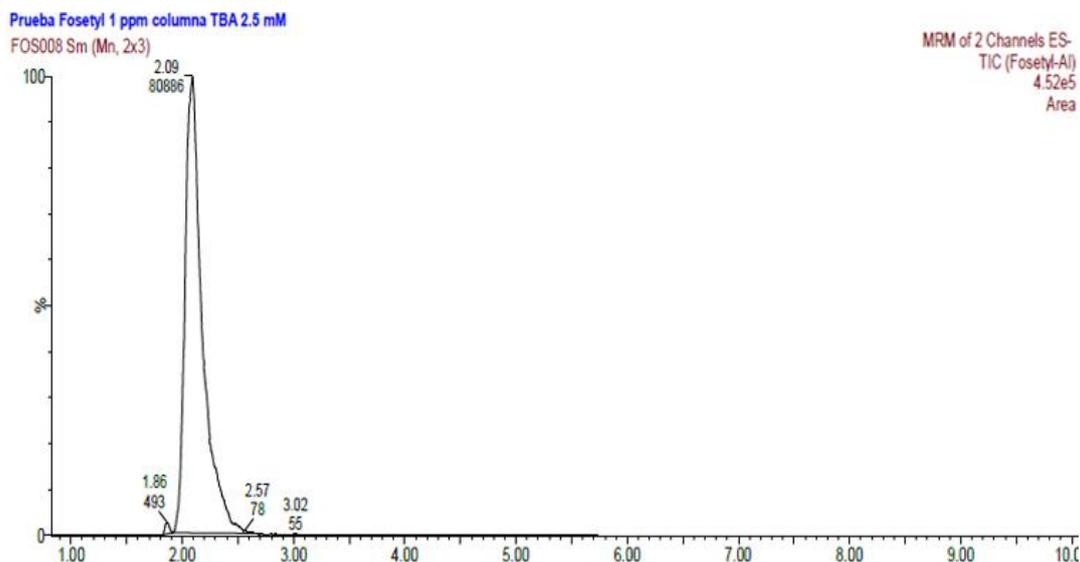


Figura AV. Cromatograma TIC obtenido para el Ácido fosfónico ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ).

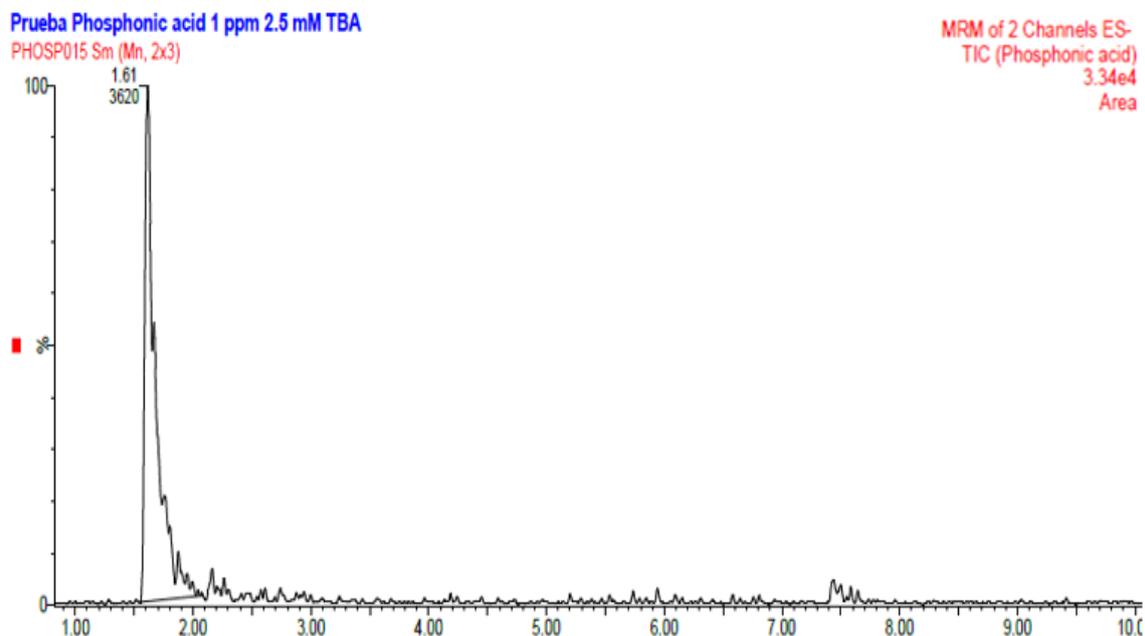
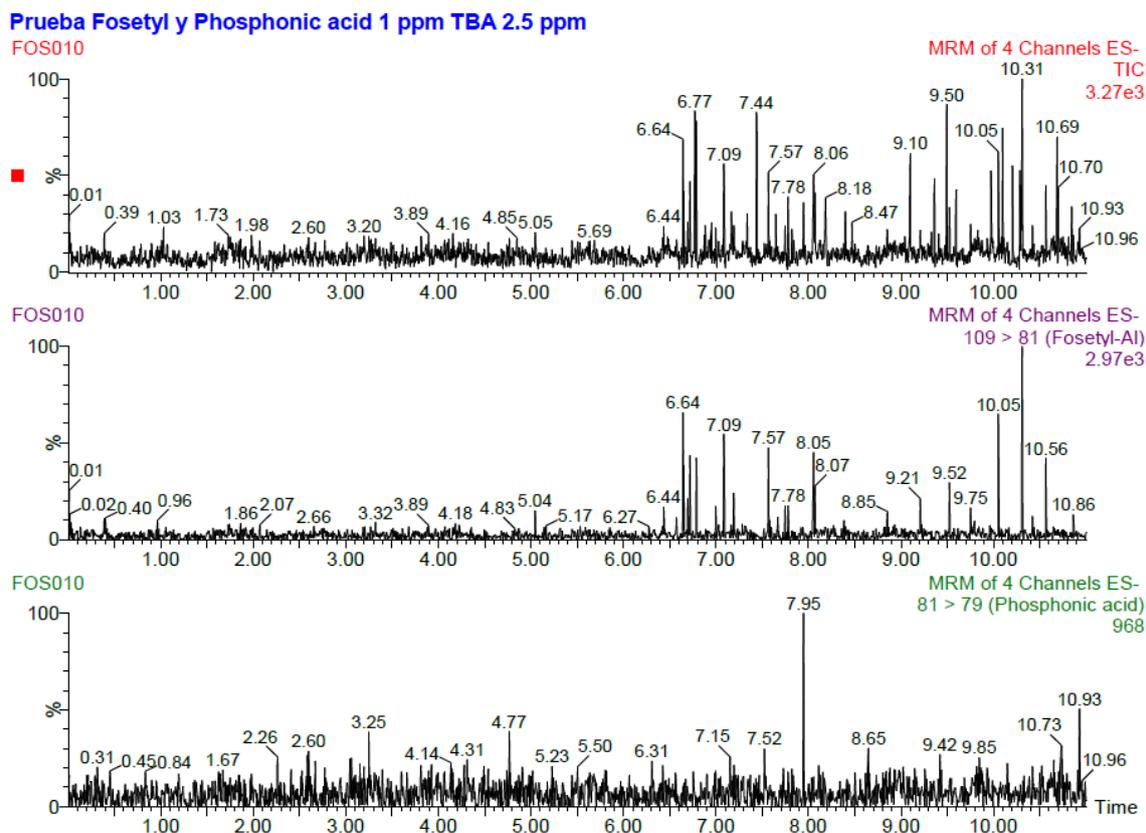
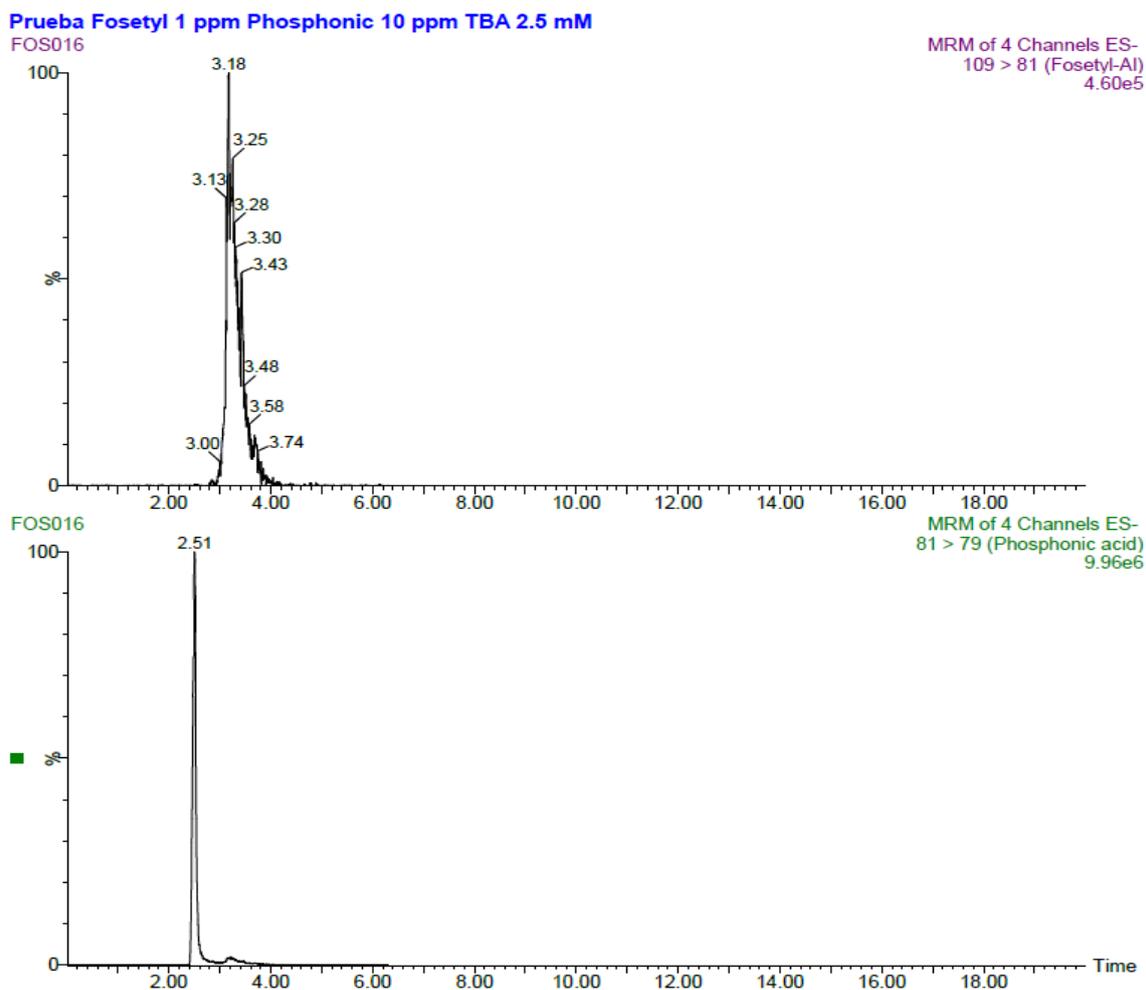


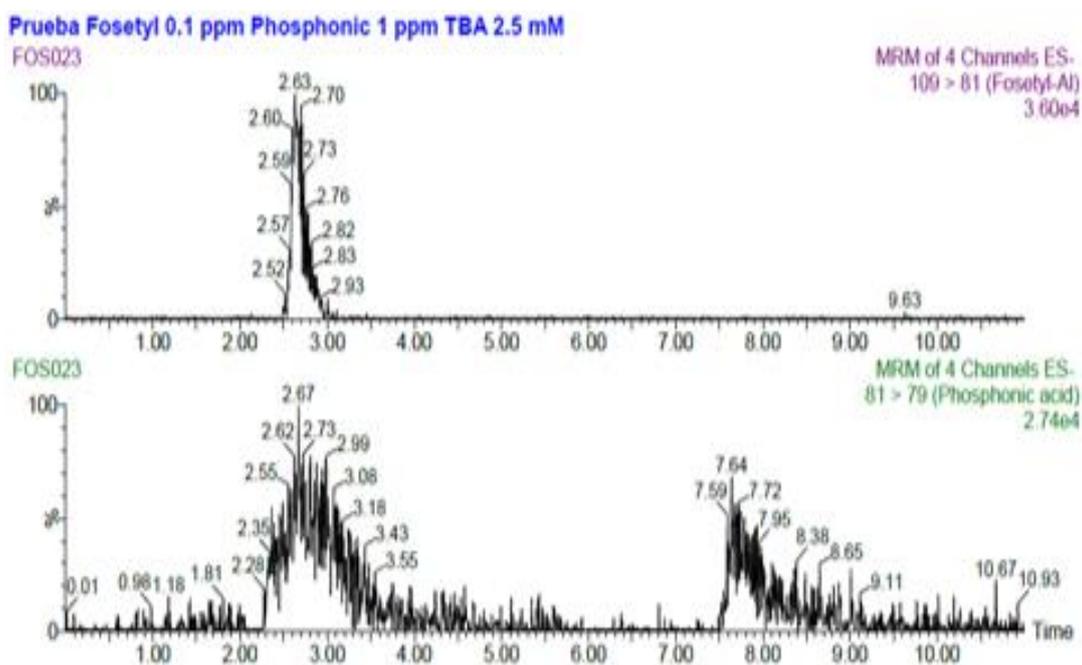
Figura AVI. Cromatograma TIC (arriba) de los dos compuestos a  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , debajo el cromatograma de la transición  $109 > 91$  del Fosetyl-Al y por último el cromatograma de la transición  $81 > 79$  del Ácido fosfónico.



**Figura AVII.** Cromatograma de la transición 109>91 a 1 mg L<sup>-1</sup> de Fosetil-Al (arriba) y cromatograma de la transición 81>79 del Ácido fosfónico (abajo) a 10 mg L<sup>-1</sup>.

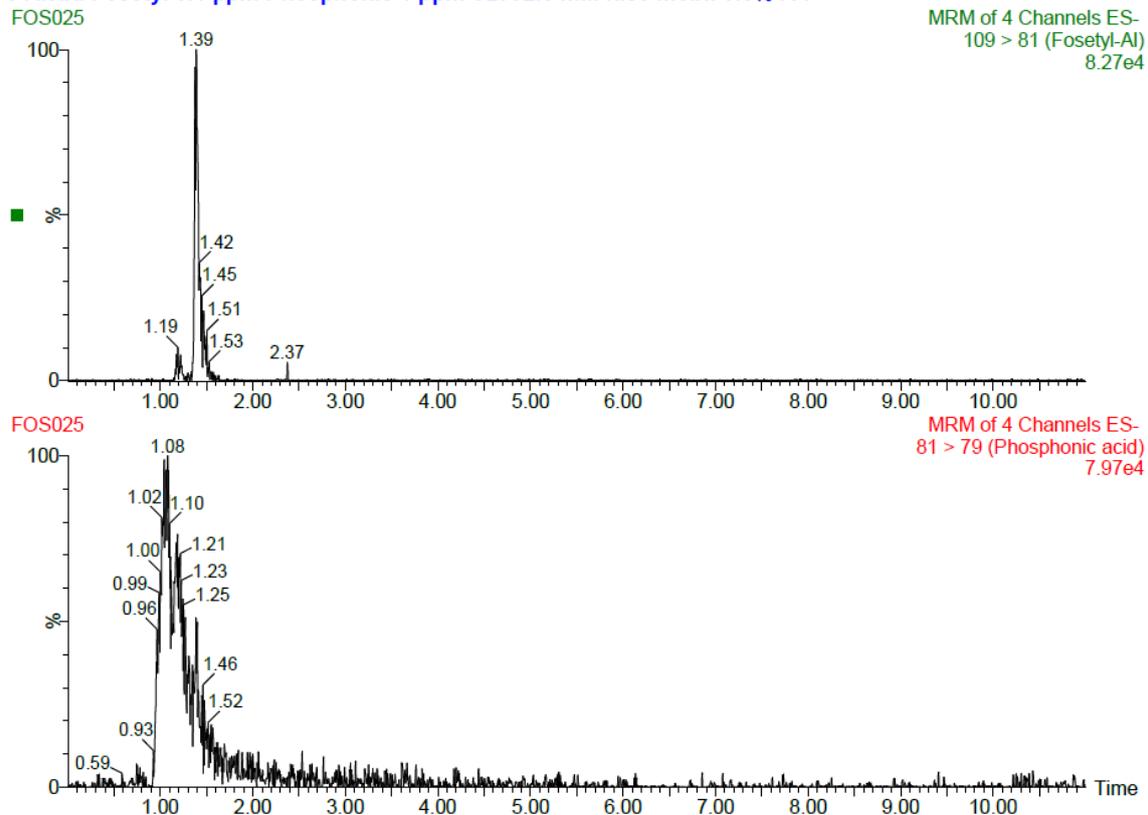


**Figura AVIII.** Cromatograma de la transición 109>91 a 0.1 mg L<sup>-1</sup> de Fosetil-Al (arriba) y cromatograma de la transición 81>79 del Ácido fosfónico (abajo) a 1 mg L<sup>-1</sup>.



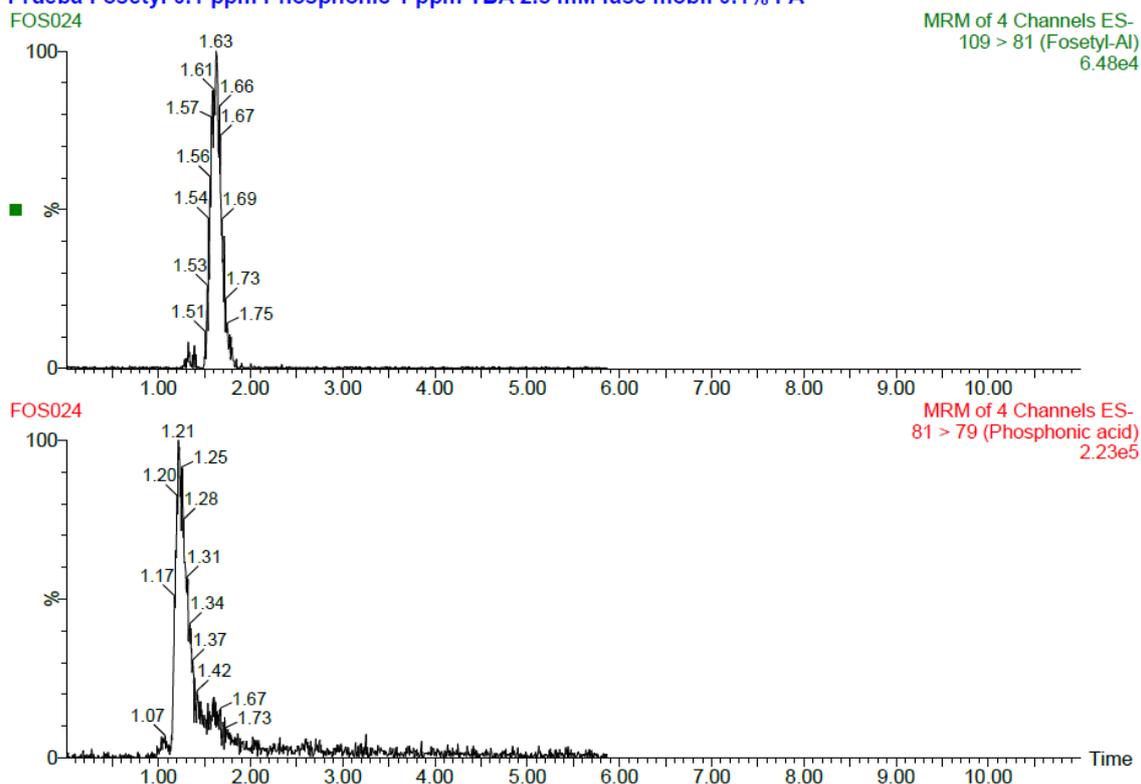
**Figura AIX.** Cromatograma de la transición 109>91 a 0.1 mg L<sup>-1</sup> de Fosetil-Al (arriba) y cromatograma de la transición 81>7 a, 1 mg L<sup>-1</sup> de Ácido fosfónico (abajo) con 0.5% de Ácido fórmico en la fase móvil.

Prueba Fosetyl 0.1 ppm Phosphonic 1 ppm TBA 2.5 mM fase mobil 0.5% FA

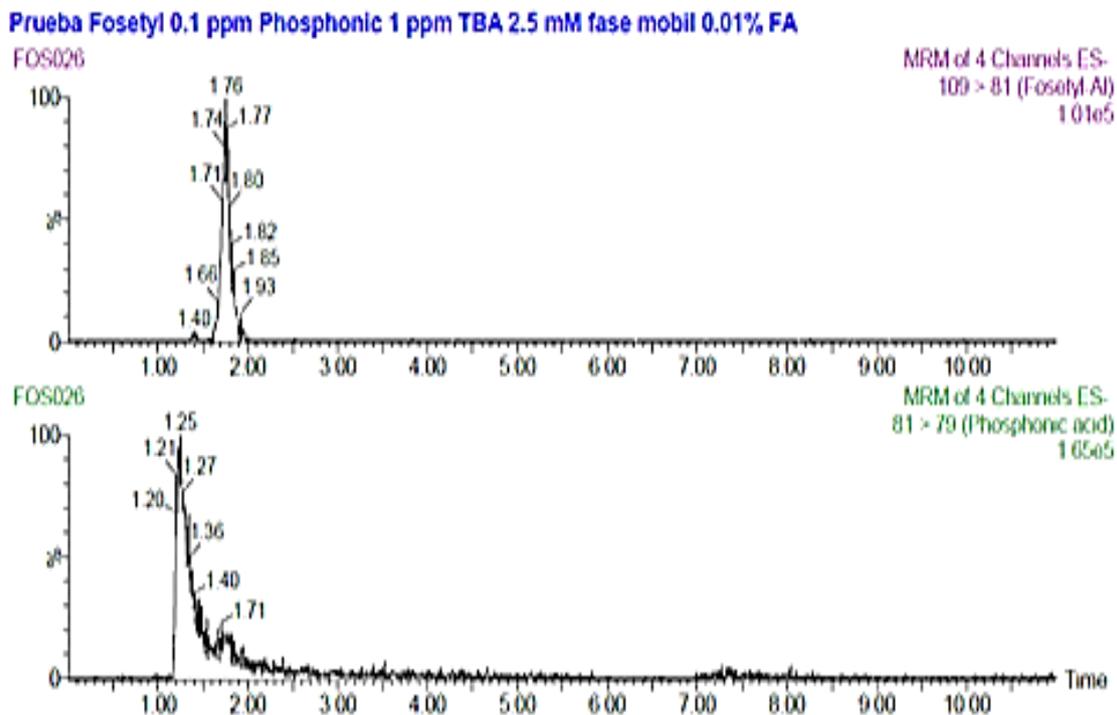


**Figura AX.** Cromatograma de la transición 109>91 a 0.1 mg L<sup>-1</sup> de Fosetil-Al (arriba) y cromatograma de la transición 81>7 a, 1 mg L<sup>-1</sup> de Ácido fosfónico (abajo) con 0.1% de Ácido fórmico en la fase móvil.

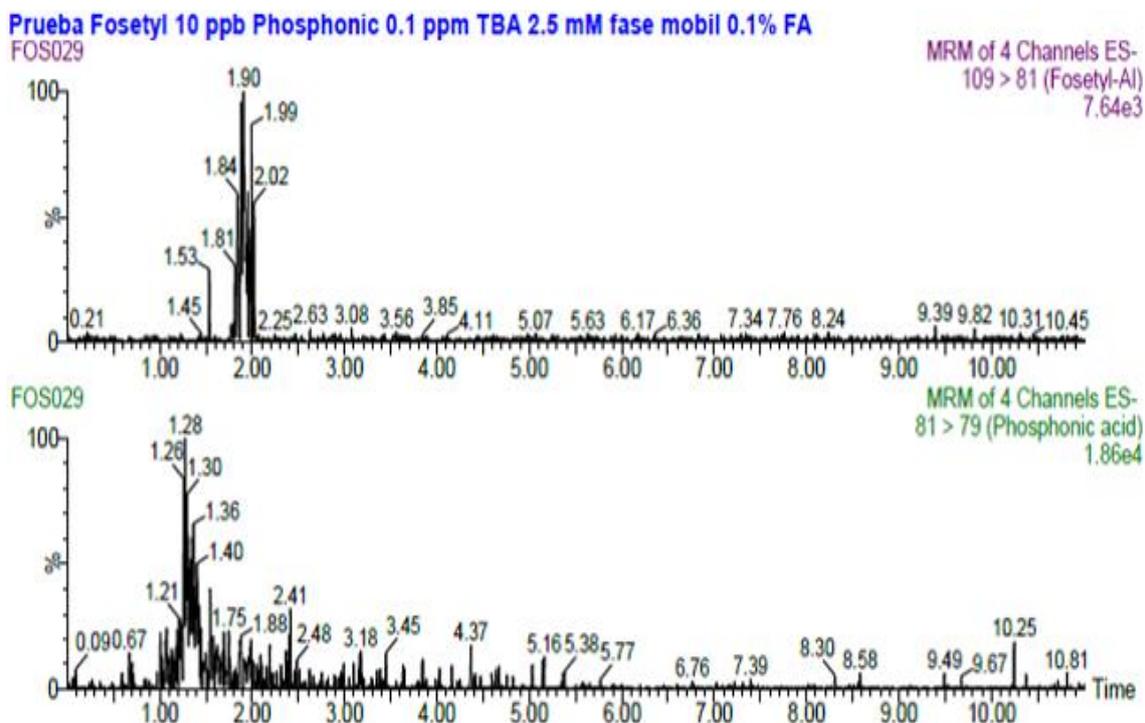
Prueba Fosetyl 0.1 ppm Phosphonic 1 ppm TBA 2.5 mM fase mobil 0.1% FA



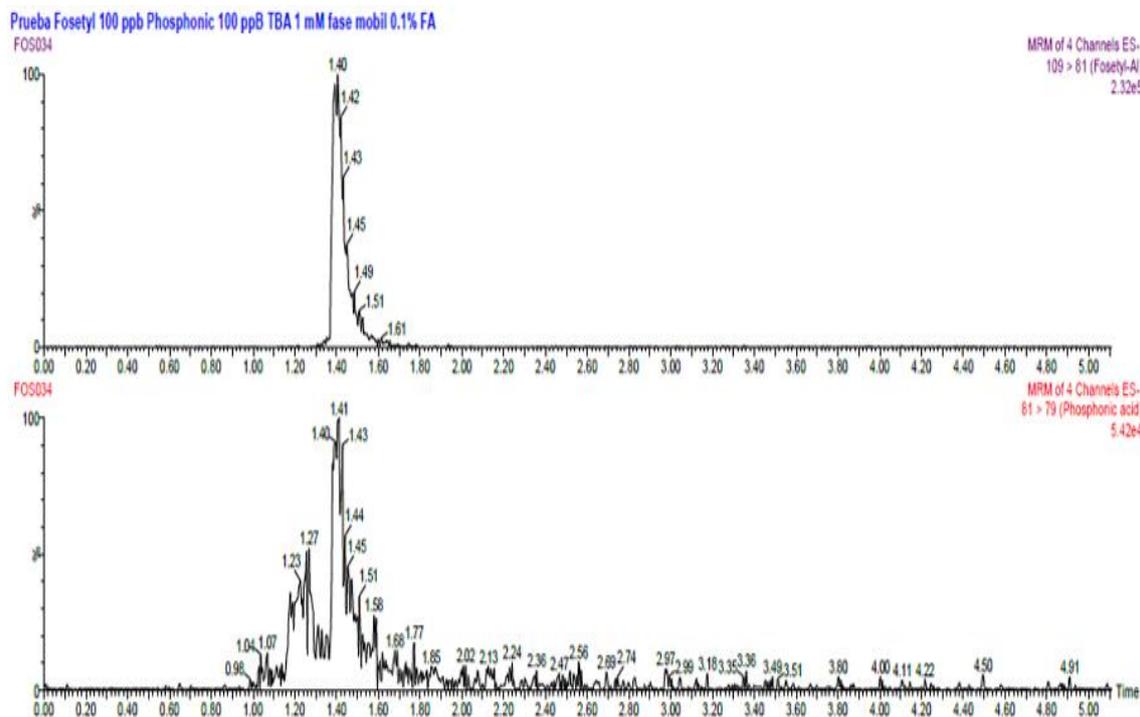
**Figura AXI.** Cromatograma de la transición 109>91 a 0.1 mg L<sup>-1</sup> de Fosetil-Al (arriba) y cromatograma de la transición 81>7 a, 1 mg L<sup>-1</sup> de Ácido fosfónico (abajo) con 0.01% de Ácido fórmico en la fase móvil.



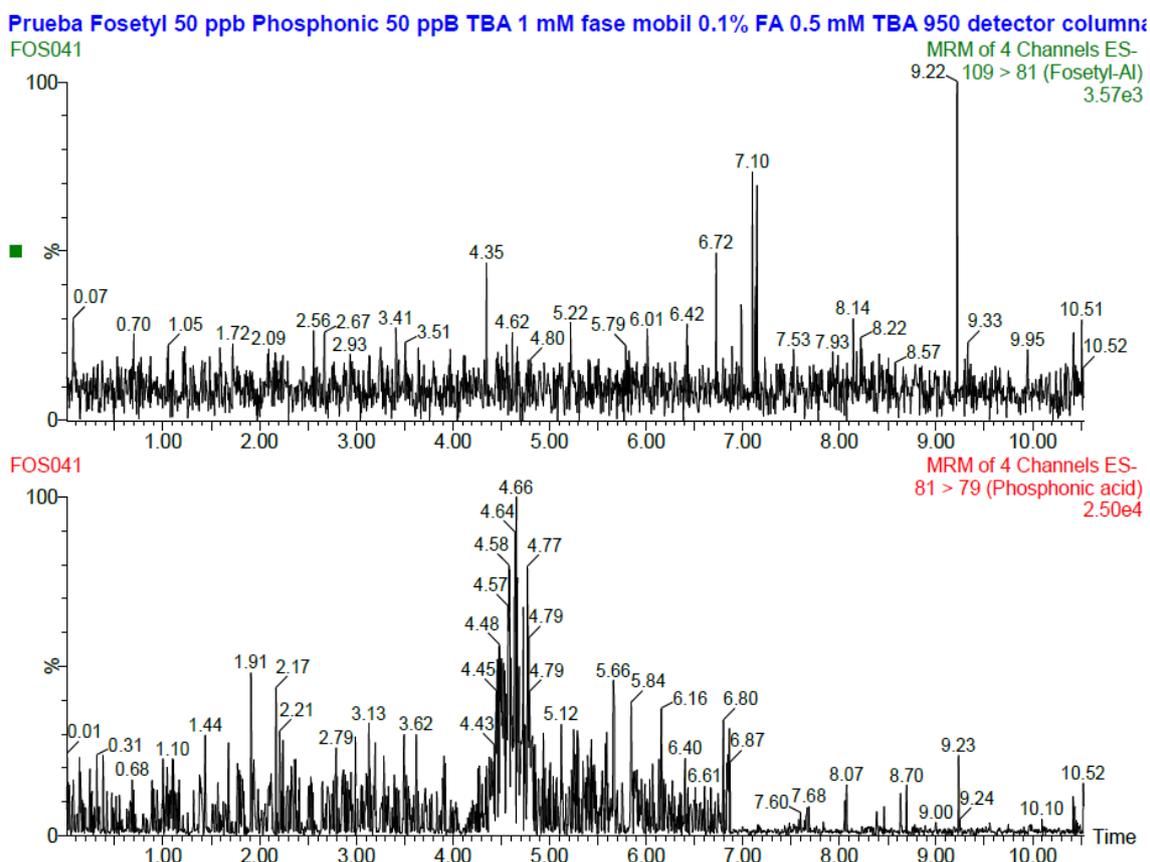
**Figura AXII.** Cromatograma de la transición 109>91 a 10 µg L<sup>-1</sup> de Fosetil-Al (arriba) y cromatograma de la transición 81>79 a 100 µg L<sup>-1</sup> de Ácido fosfónico (abajo) con 0.1% de Ácido fórmico en la fase móvil.



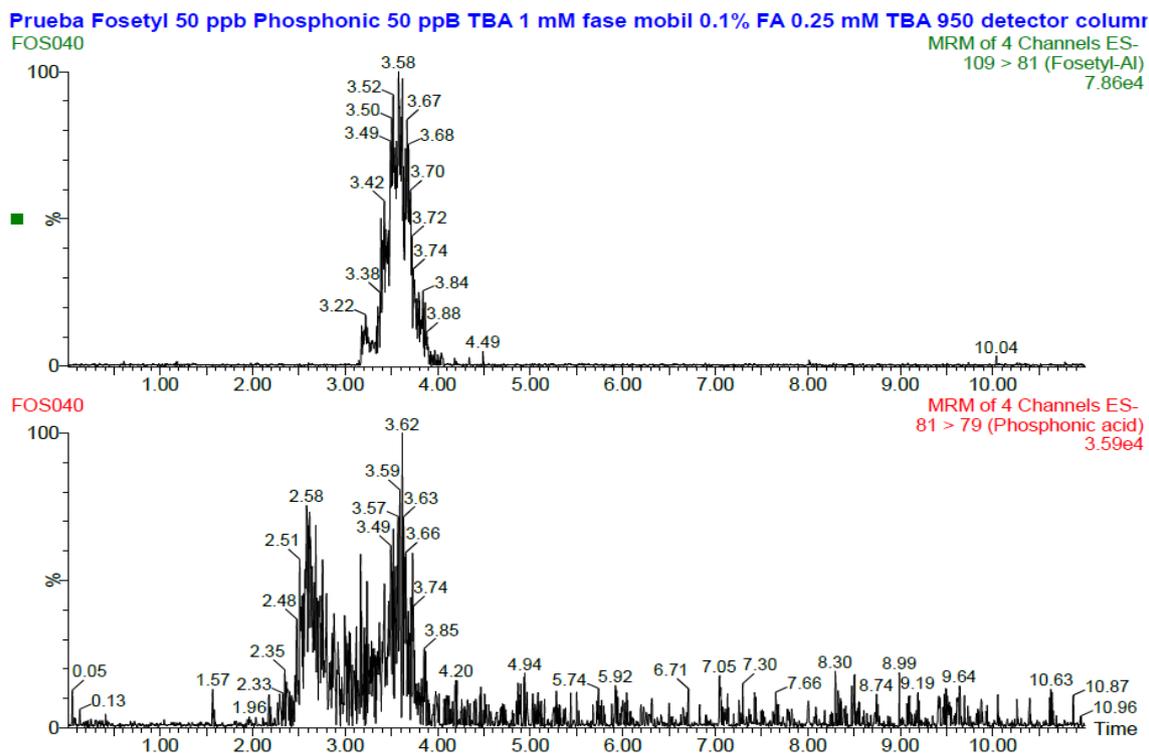
**Figura AXIII.** Cromatograma de la transición 109>91 a 100 µg L<sup>-1</sup> de Fosetil-Al (arriba) y cromatograma de la transición 81>79 a 100 µg L<sup>-1</sup> de Ácido fosfónico (abajo) con 0.1% de Ácido fórmico en la fase móvil y Metanol como disolvente orgánico.



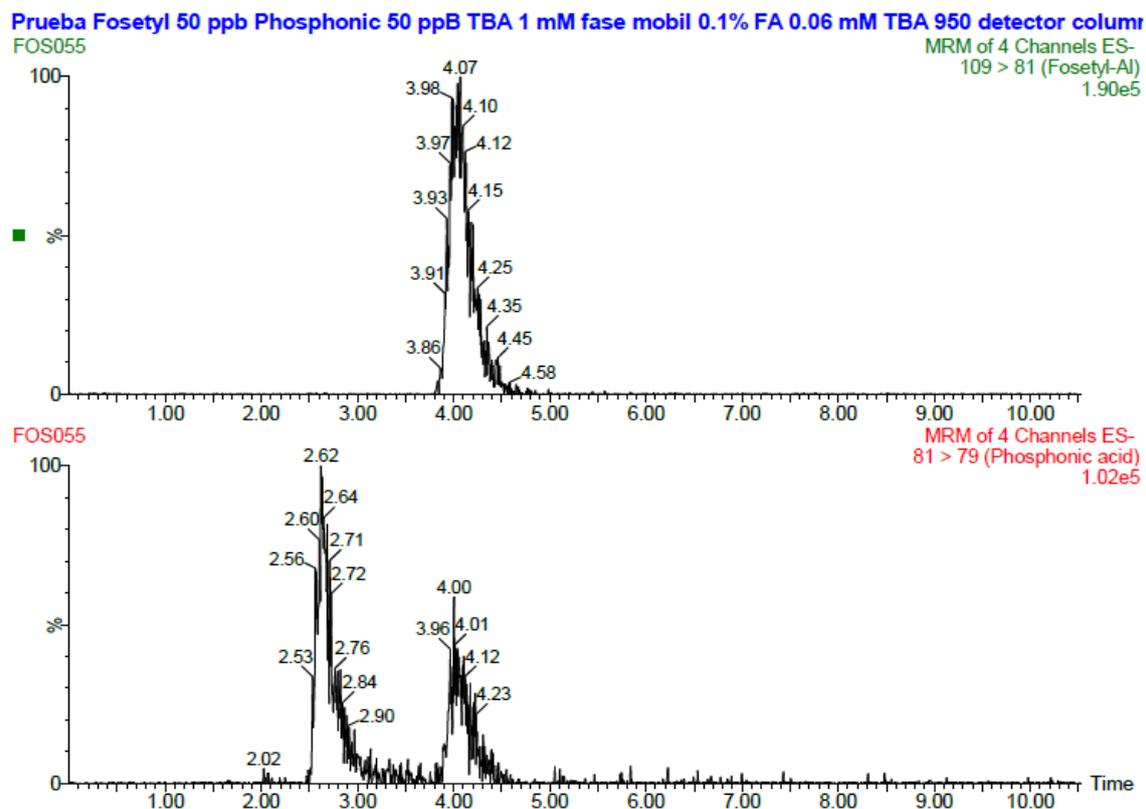
**Figura AXIV.** Cromatograma de la transición 109>91 a 50 µg L<sup>-1</sup> de Fosetil-Al (arriba) y cromatograma de la transición 81>79 a 50 µg L<sup>-1</sup> de Ácido fosfónico (abajo) con 0.1% de Ácido fórmico y 0.5 mM de TBA en la fase móvil y Metanol como disolvente orgánico.



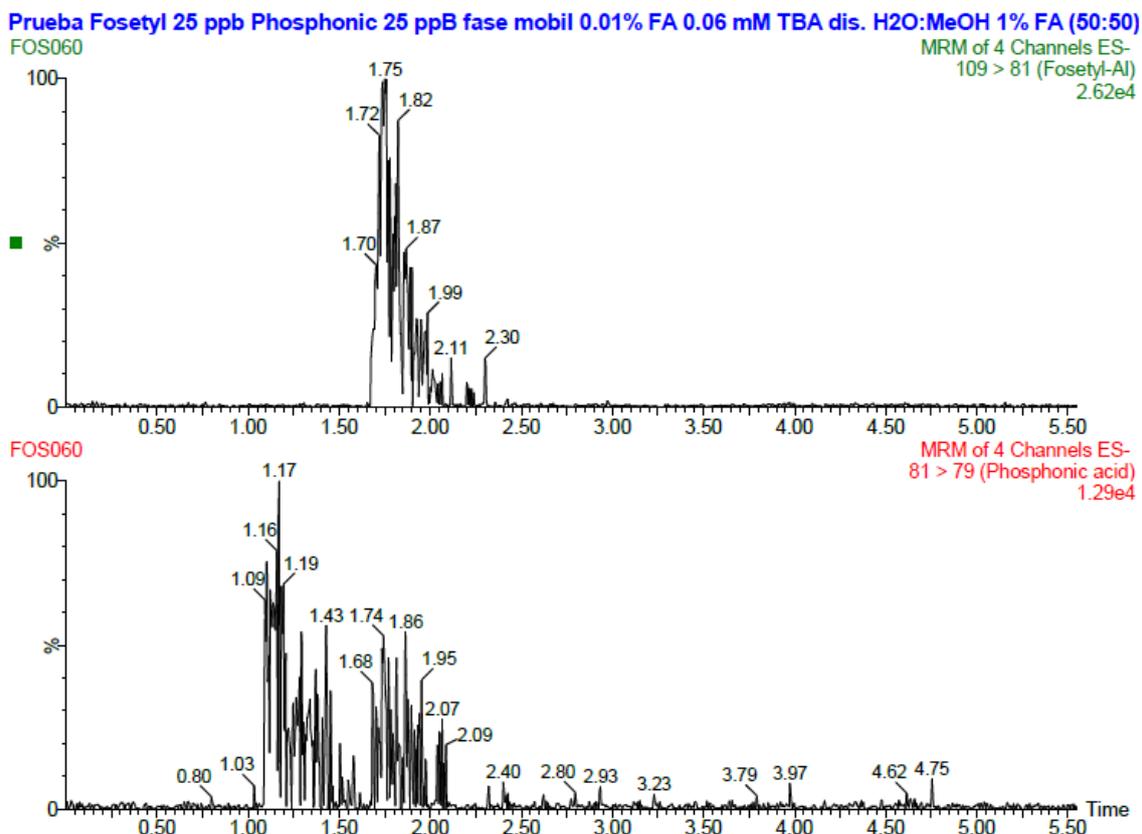
**Figura AXV.** Cromatograma de la transición 109>91 a  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de Fosetil-Al (arriba) y cromatograma de la transición 81>79 a  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de Ácido fosfónico (abajo) con 0.1% de Ácido fórmico y 0.25 mM de TBA en la fase móvil y Metanol como disolvente orgánico.



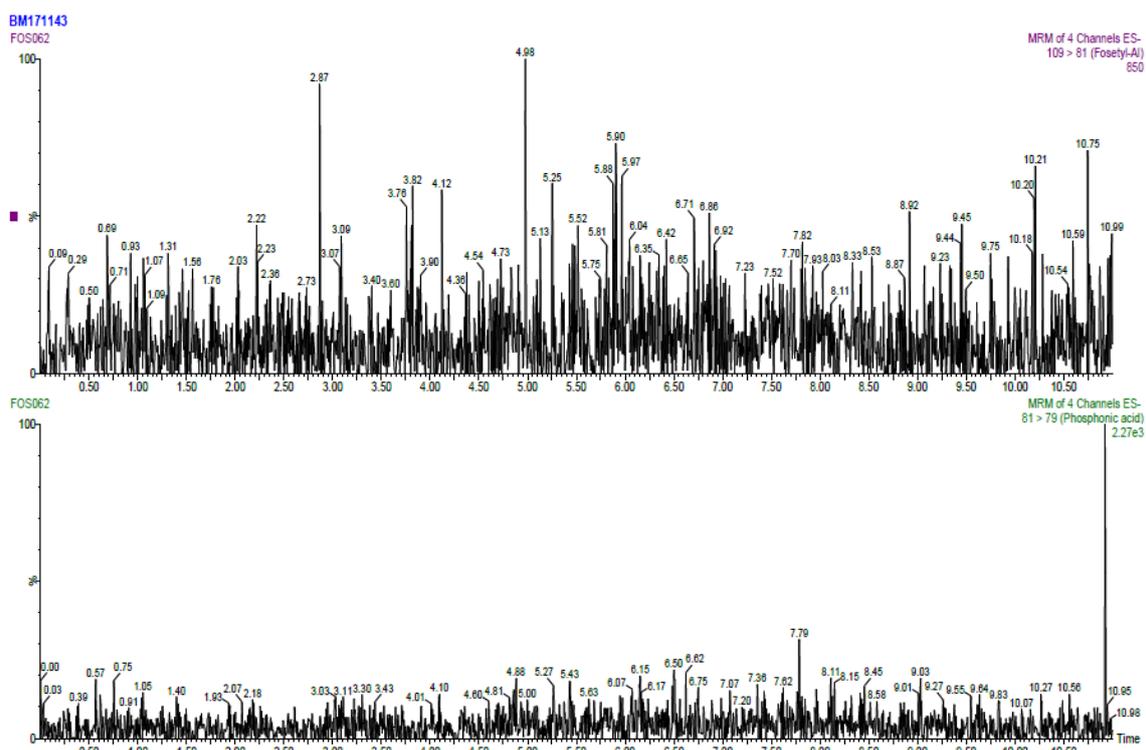
**Figura AXVI.** Cromatograma de la transición 109>91 a  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de Fosetil-Al (arriba) y cromatograma de la transición 81>79 a  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de Ácido fosfónico (abajo) con 0.1% de Ácido fórmico y 0.06 mM de TBA en la fase móvil y Metanol como disolvente orgánico.



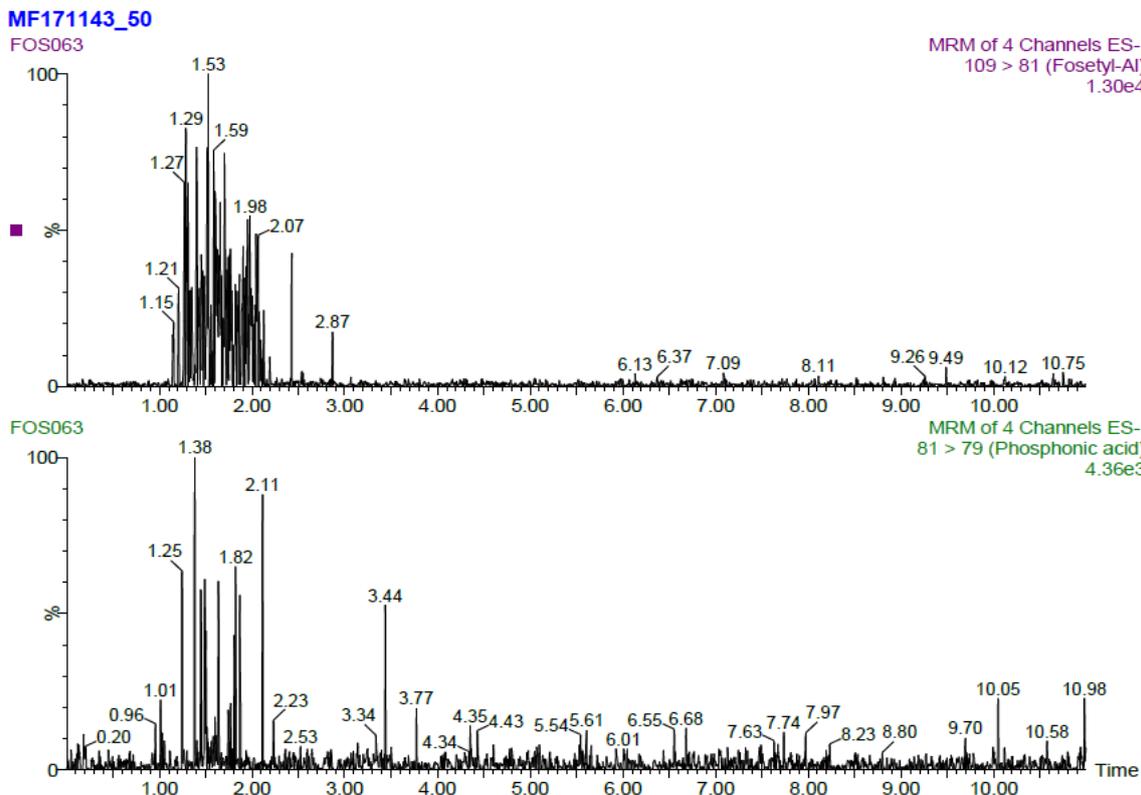
**Figura AXVII.** Cromatograma de la transición 109>91 a 25 µg L<sup>-1</sup> de Fosetil-Al (arriba) y cromatograma de la transición 81>79 a 25 µg L<sup>-1</sup> de Ácido fosfónico (abajo) con 0.1% de Ácido fórmico y 0.06 mM de TBA en la fase móvil y Metanol como disolvente orgánico.



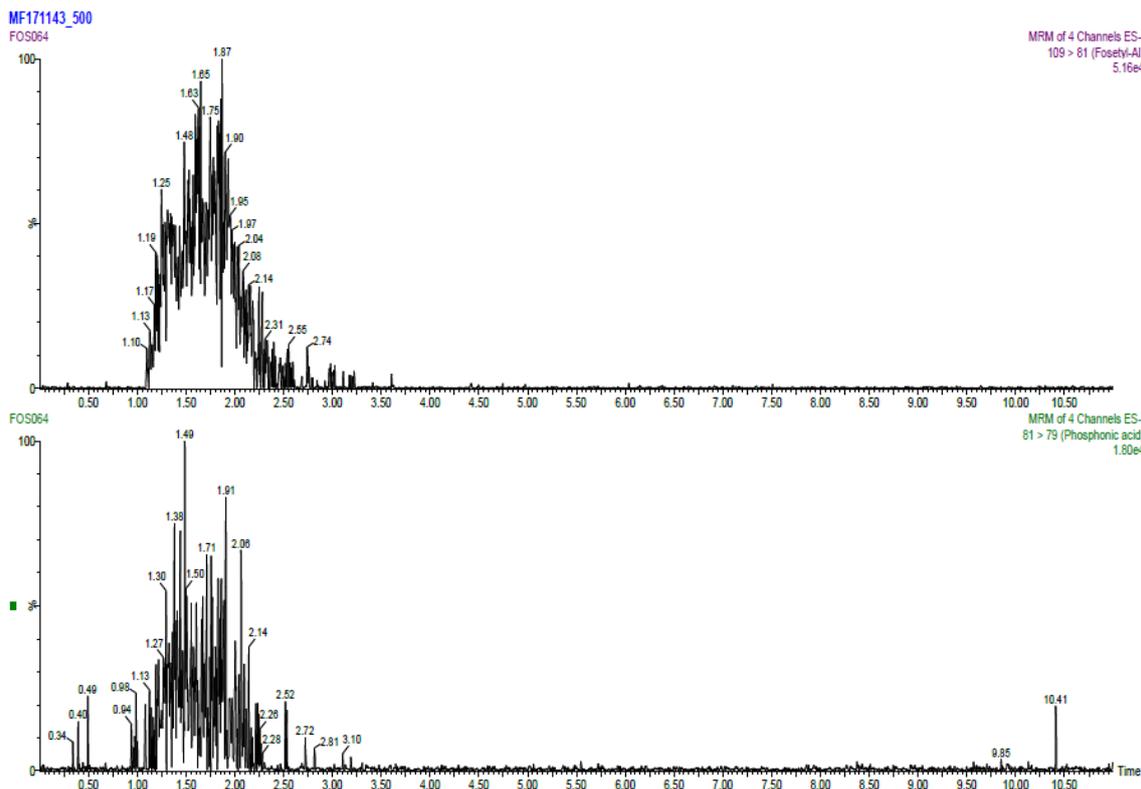
**Figura AXVIII.** Blanco muestra de naranja, arriba se encuentra el cromatograma de la transición 109>91 del Fosetil-Al y cromatograma de la transición 81>79 del Ácido fosfónico (abajo) con 0.1% de Ácido fórmico y 0.06 mM de TBA en la fase móvil y Metanol como disolvente orgánico.



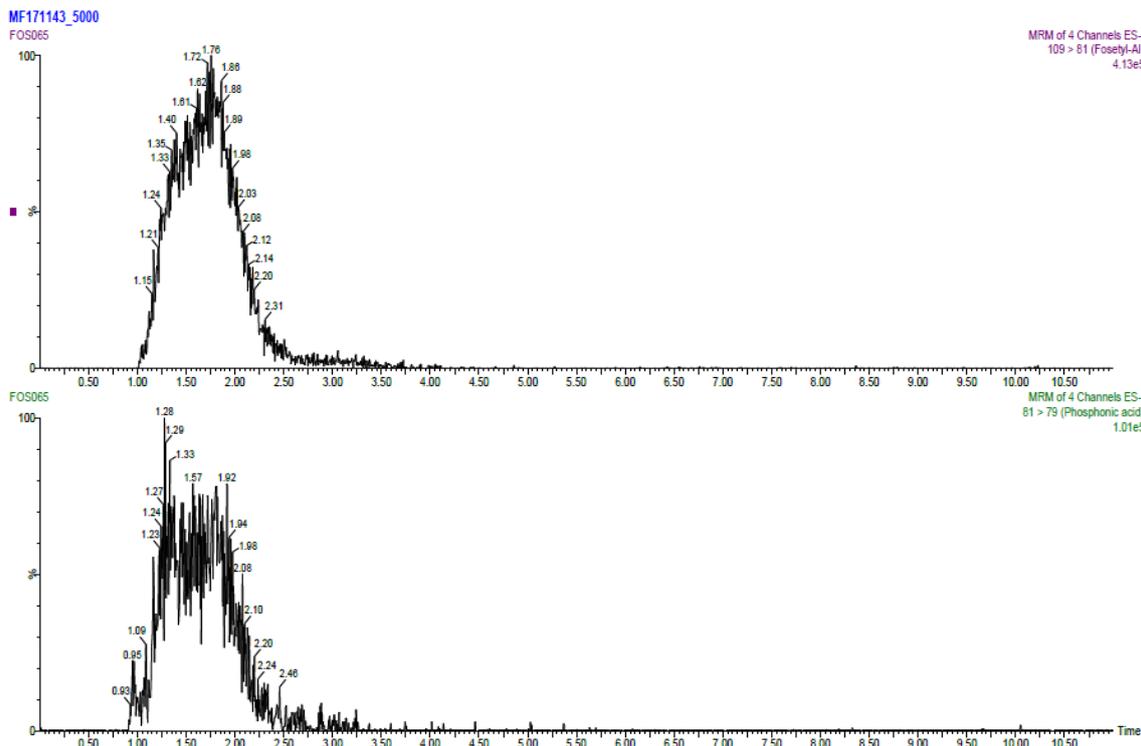
**Figura AXIX.** Muestra fortificada 50  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ , arriba se encuentra el cromatograma de la transición 109>91 del Fosetil-Al y abajo el cromatograma de la transición 81>79 del Ácido fosfónico con 0.1% de Ácido fórmico y 0.06 mM de TBA en la fase móvil y Metanol como disolvente orgánico.



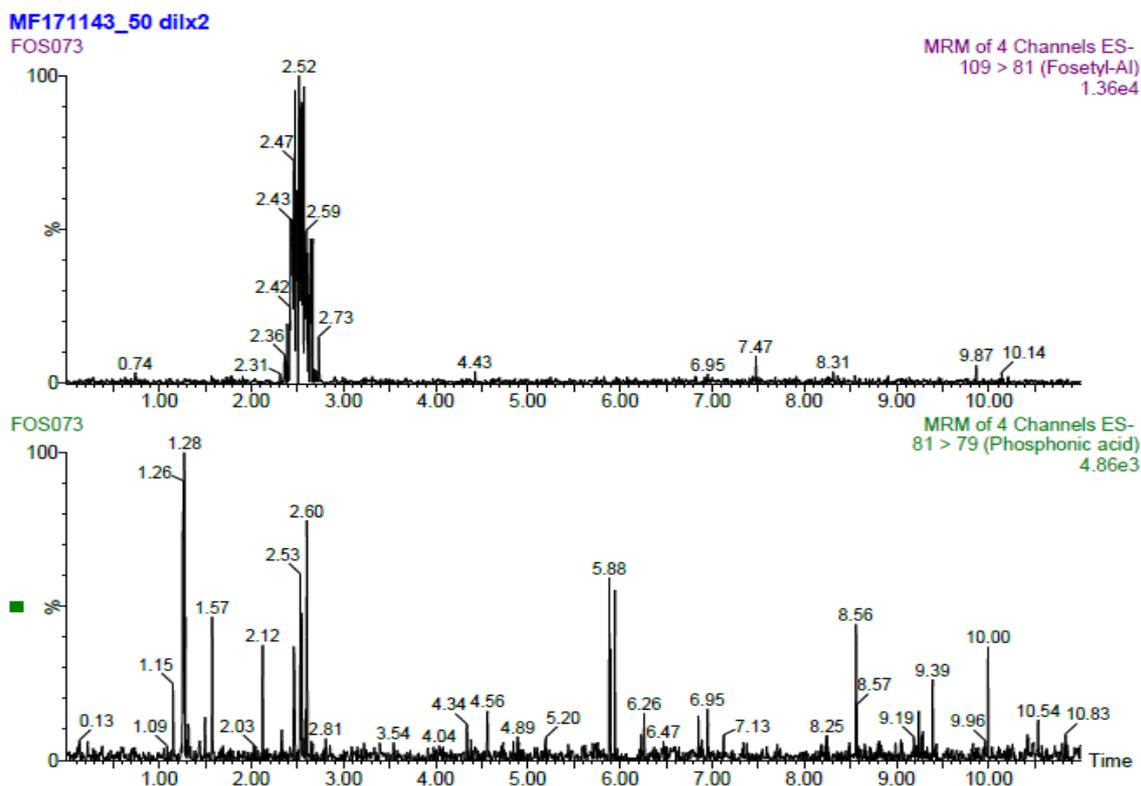
**Figura AXX.** Muestra fortificada 500  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ , arriba se encuentra el cromatograma de la transición 109>91 del Fosetil-Al y abajo el cromatograma de la transición 81>79 del Ácido fosfónico con 0.1% de Ácido fórmico y 0.06 mM de TBA en la fase móvil y Metanol como disolvente orgánico.



**Figura AXXI.** Muestra fortificada 5000  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ , arriba se encuentra el cromatograma de la transición 109>91 del Fosetil-Al y abajo el cromatograma de la transición 81>79 del Ácido fosfónico con 0.1% de Ácido fórmico y 0.06 mM de TBA en la fase móvil y Metanol como disolvente orgánico.

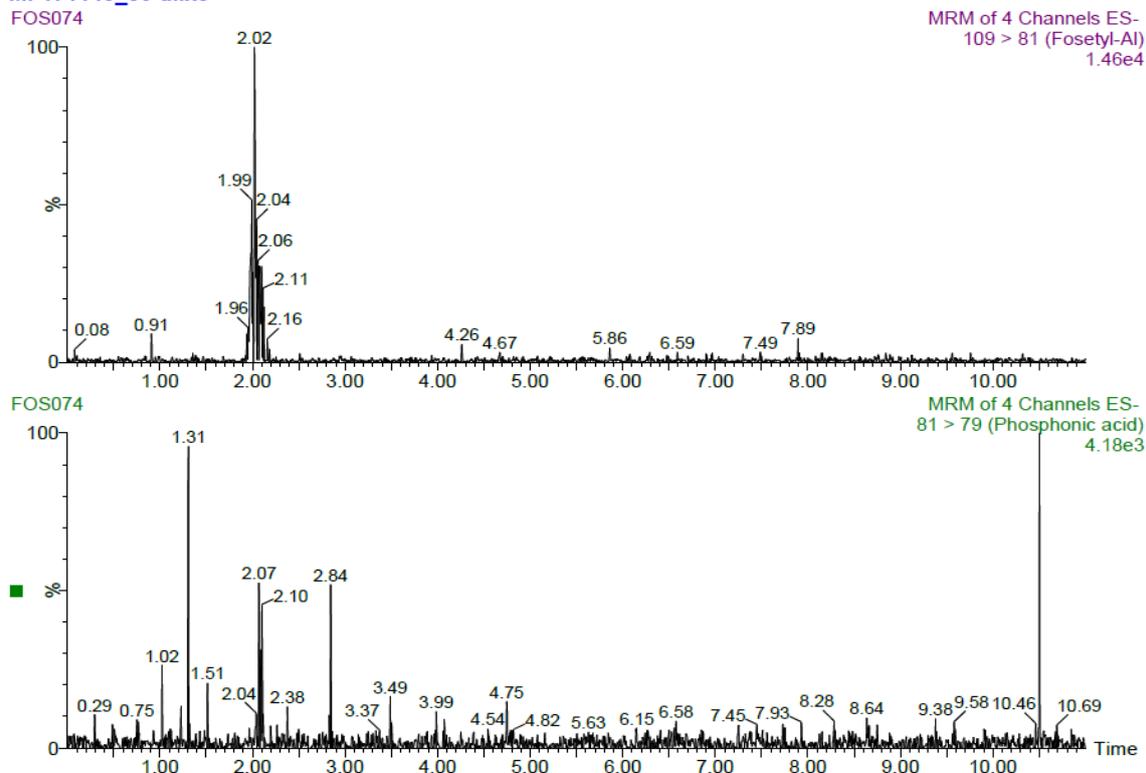


**Figura AXXII.** Muestra fortificada 50  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  diluida x2, arriba se encuentra el cromatograma de la transición 109>91 del Fosetil-Al y abajo el cromatograma de la transición 81>79 del Ácido fosfónico con 0.1% de Ácido fórmico y 0.06 mM de TBA en la fase móvil y Metanol como disolvente orgánico.



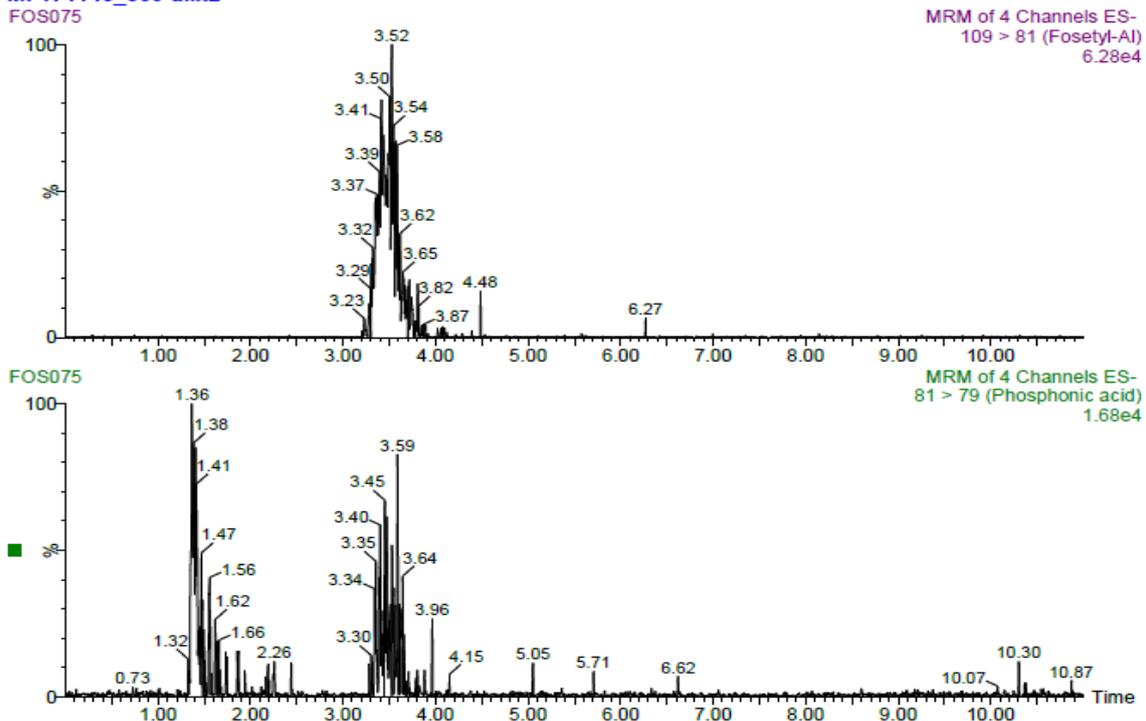
**Figura AXXIII.** Muestra fortificada  $50 \mu\text{g Kg}^{-1}$  diluida  $\times 5$ , arriba se encuentra el cromatograma de la transición  $109 > 91$  del Fosetil-Al y abajo el cromatograma de la transición  $81 > 79$  del Ácido fosfónico con  $0.1\%$  de Ácido fórmico y  $0.06 \text{ mM}$  de TBA en la fase móvil y Metanol como disolvente orgánico

MF171143\_50 dilx5

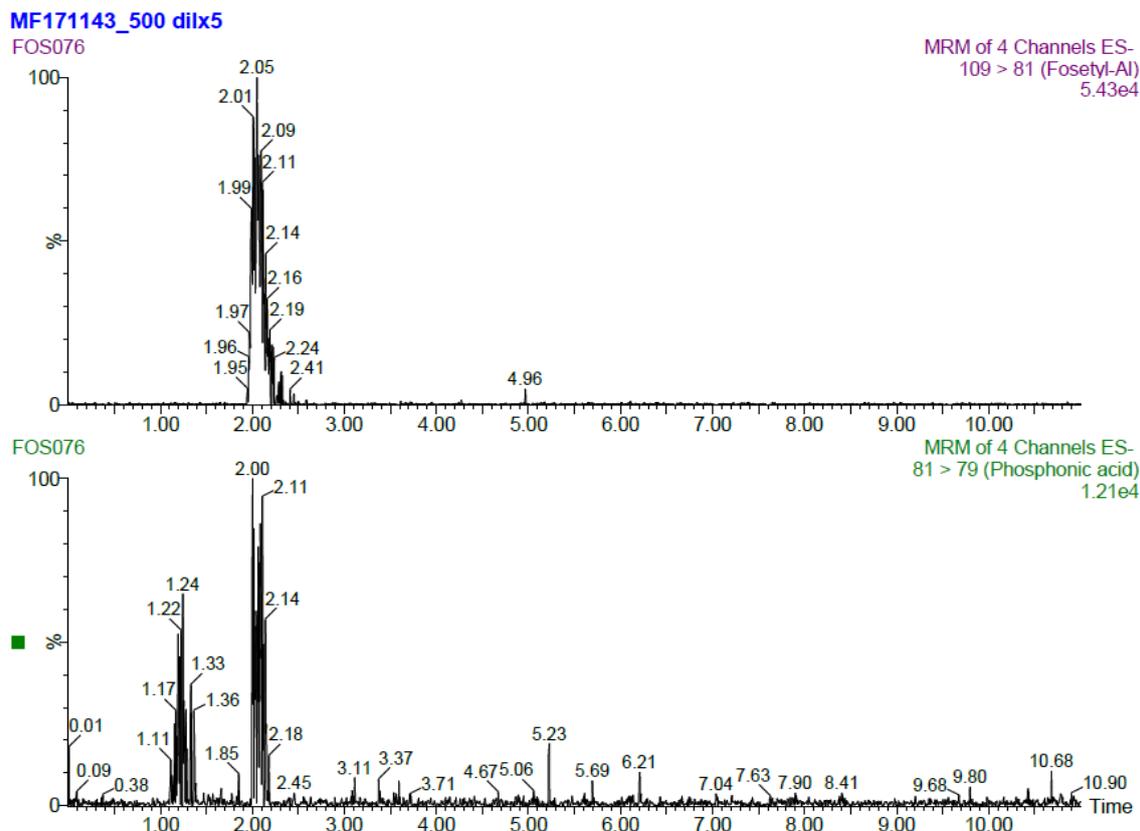


**Figura AXXIV.** Muestra fortificada  $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$  diluida  $\times 2$ , arriba se encuentra el cromatograma de la transición  $109 > 91$  del Fosetil-Al y abajo el cromatograma de la transición  $81 > 79$  del Ácido fosfónico con  $0.1\%$  de Ácido fórmico y  $0.06 \text{ mM}$  de TBA en la fase móvil y Metanol como disolvente orgánico

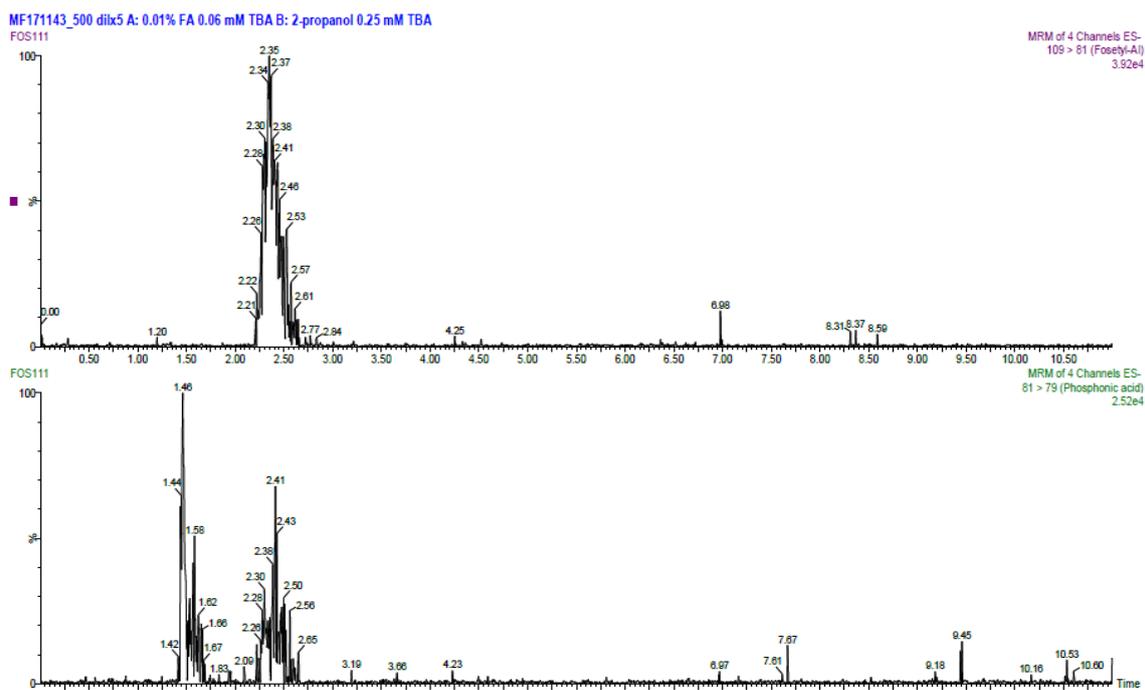
MF171143\_500 dilx2



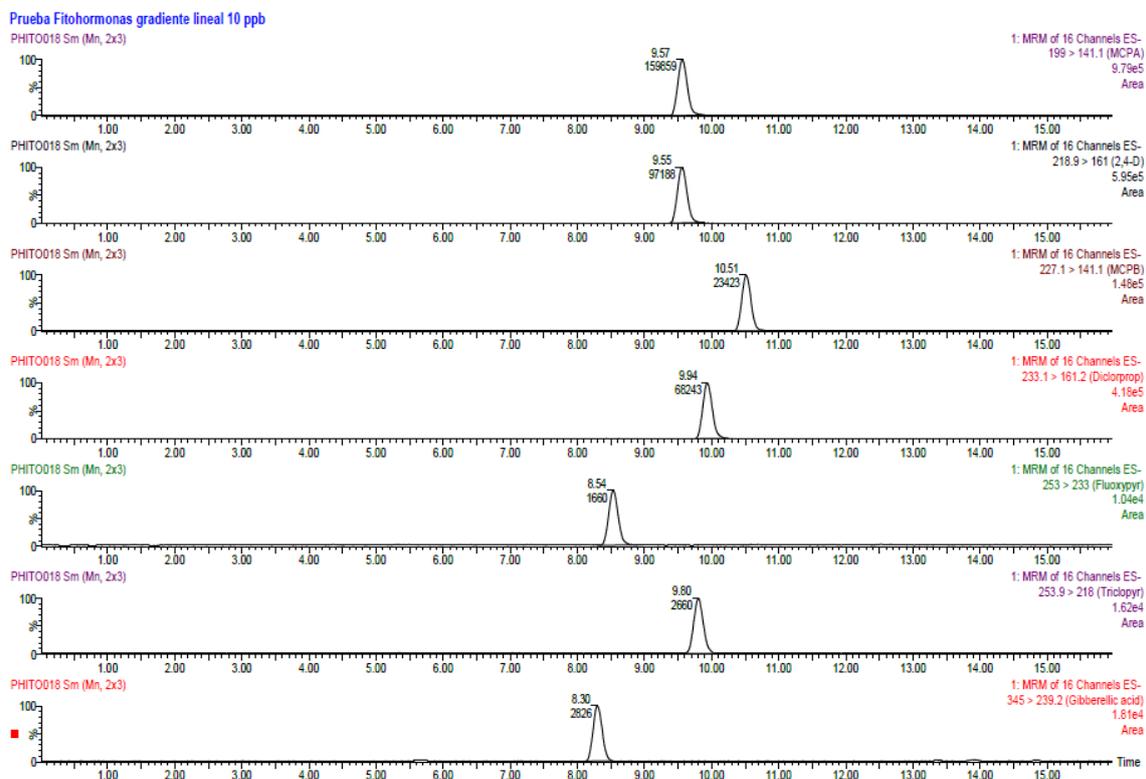
**Figura AXXV.** Muestra fortificada  $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$  diluida  $\times 5$ , arriba se encuentra el cromatograma de la transición  $109 > 91$  del Fosetil-Al y abajo el cromatograma de la transición  $81 > 79$  del Ácido fosfónico con  $0.1\%$  de Ácido fórmico y  $0.06 \text{ mM}$  de TBA en la fase móvil y Metanol como disolvente orgánico



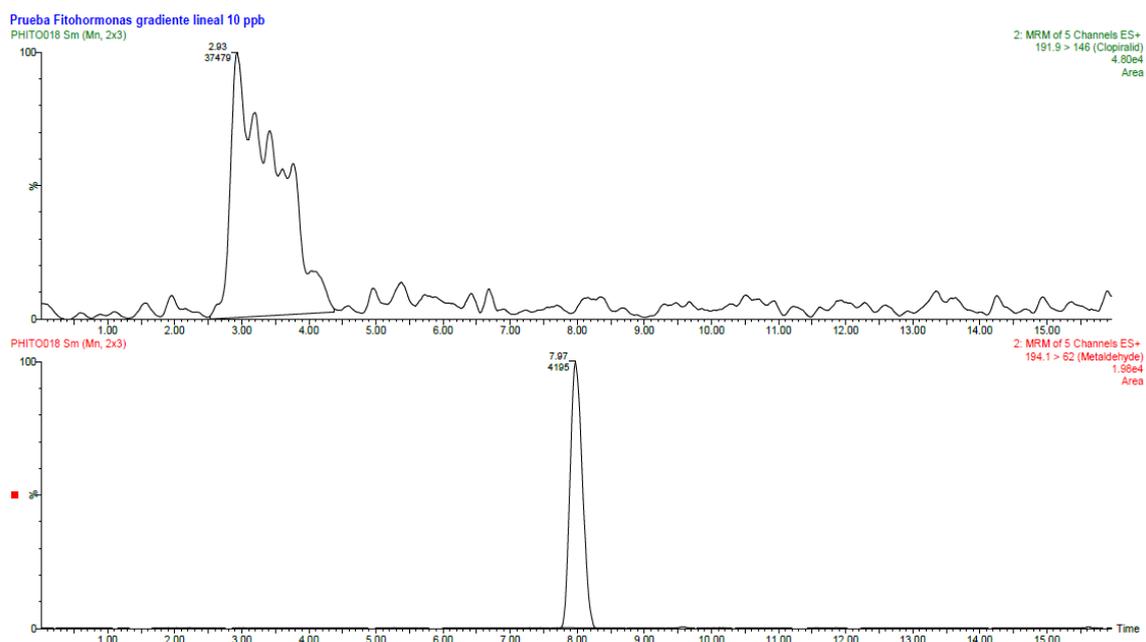
**Figura AXXVI.** Muestra fortificada  $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$  diluida  $\times 5$ , arriba se encuentra el cromatograma de la transición  $109 > 91$  del Fosetil-Al y abajo el cromatograma de la transición  $81 > 79$  del Ácido fosfónico con  $0.1\%$  de Ácido fórmico y  $0.06 \text{ mM}$  de TBA en la fase móvil y 2-propanol como disolvente orgánico



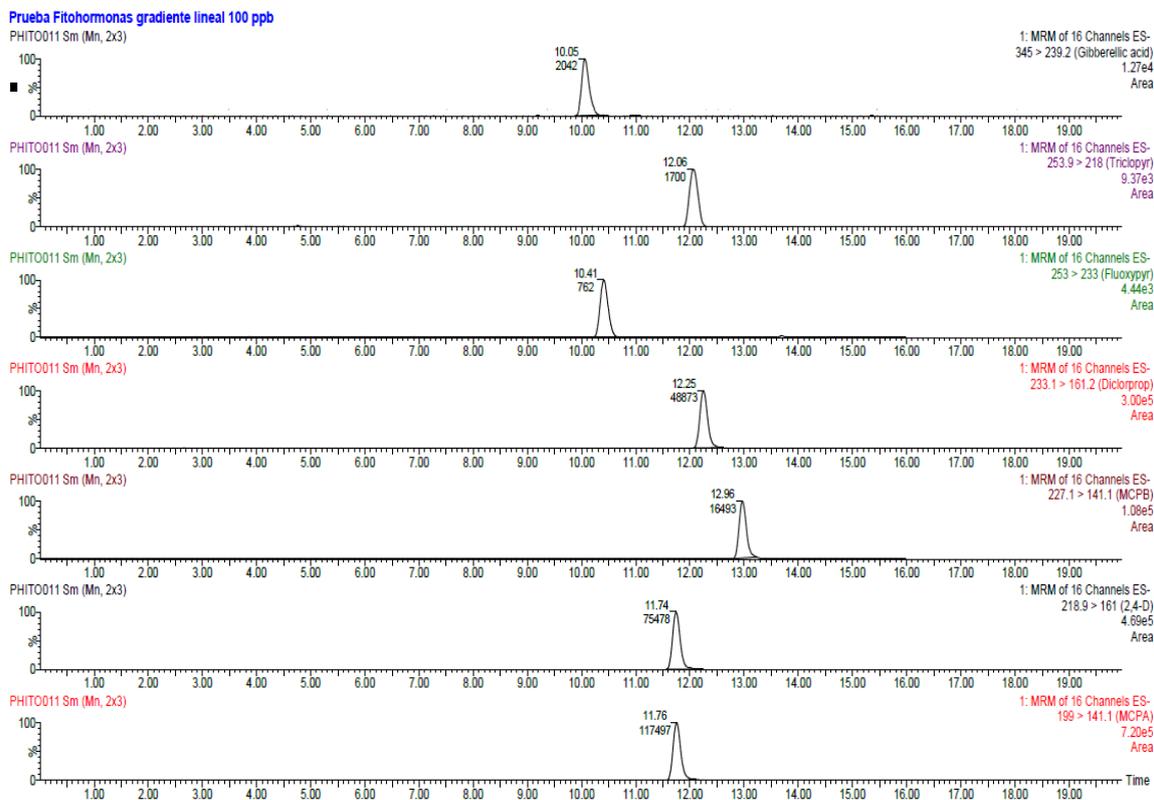
**Figura AXXVII.** Patrones de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de plaguicidas ácidos en ESI-, arriba se encuentra el cromatograma con la transición 199>141.1 del MCPA, debajo el cromatograma con la transición 218.9>161 del 2,4-D, luego el cromatograma con la transición 227.1>141.1 del MCPB, a continuación, el cromatograma con la transición 233.1>161.2 del Diclorprop, debajo el cromatograma con la transición 253>233 del Fluroxipir, luego el cromatograma con la transición 253.9>218 del Triclopir y por último, el cromatograma con la transición 345>239.2 del Ácido giberélico.



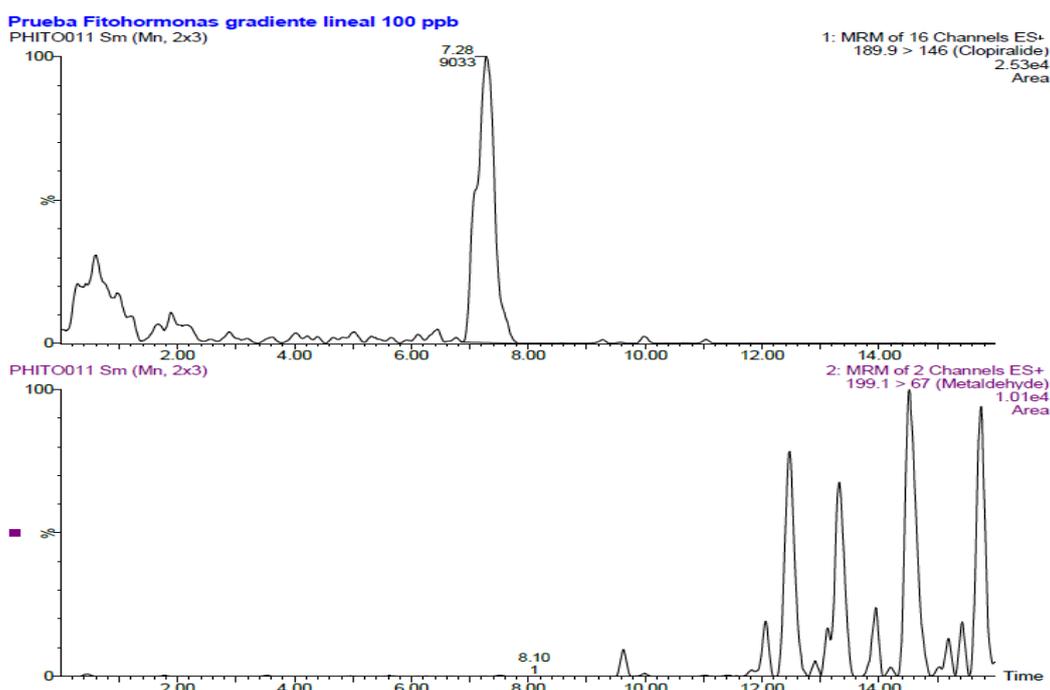
**Figura AXXVIII.** Patrones de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  acerca de los plaguicidas ácidos en ESI+, arriba se encuentra el cromatograma con la transición 191.9>146 de la Clopiralida y debajo el cromatograma con la transición 199.1>62 del Metaldehído.



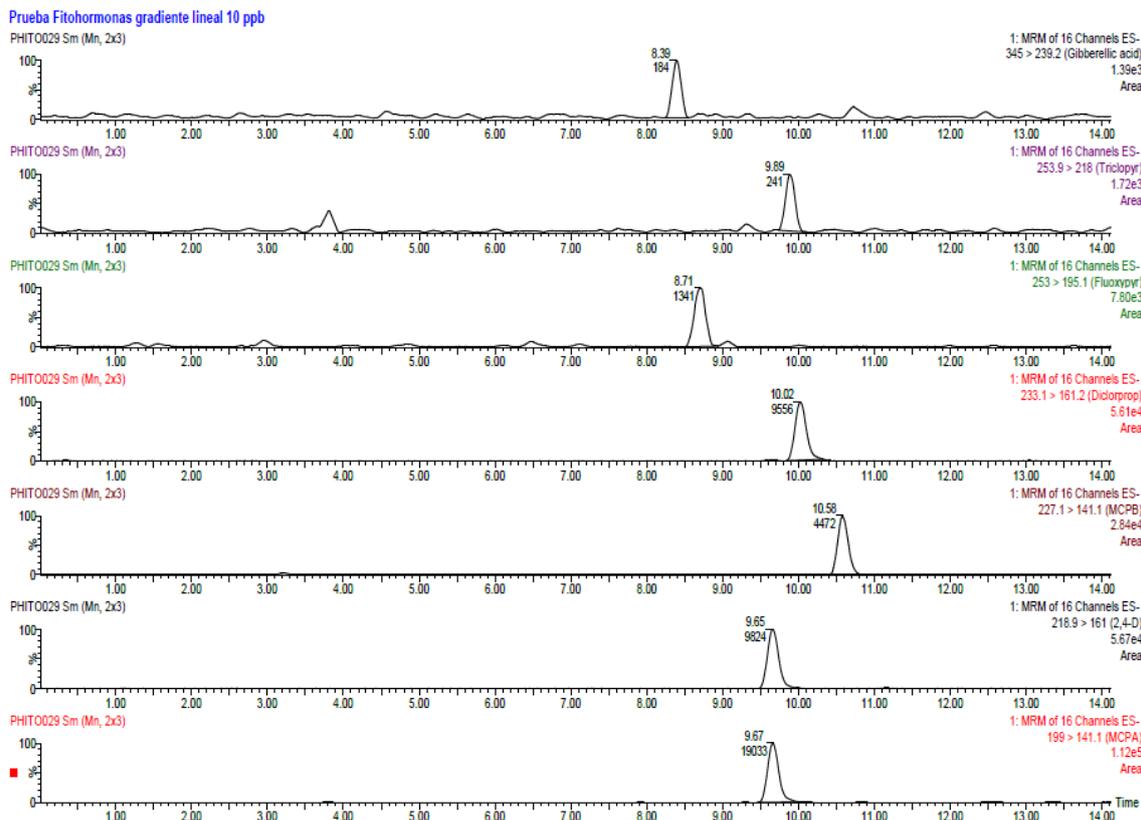
**Figura AXXIX.** Patrones de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de plaguicidas ácidos en ESI-, arriba se encuentra el cromatograma con la transición 345>239.2 del Ácido giberélico, debajo el cromatograma con la transición 253.9>218 del Triclopir, luego el cromatograma con la transición 253>233 del Fluroxipir, a continuación, el cromatograma con la transición 233.1>161.2 del Diclorprop, luego el cromatograma con la transición 227.1>141.1 del MCPB, debajo el cromatograma con la transición 218.9>161 del 2,4-D y por último, el cromatograma con la transición 199>141.1 del MCPA.



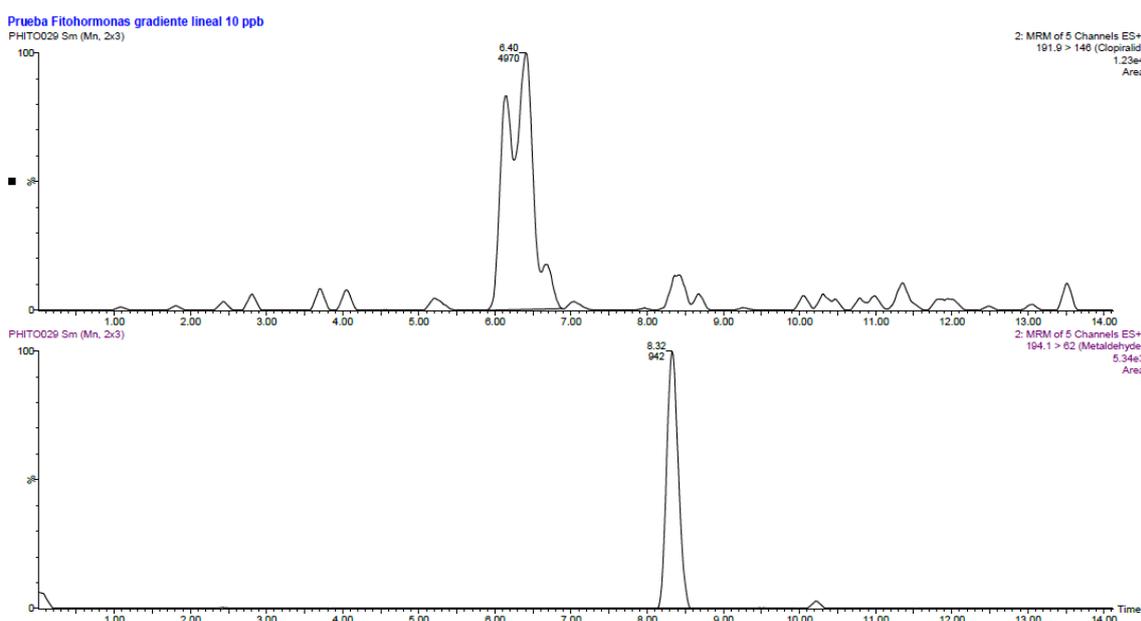
**Figura AXXX.** Patrones de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  acerca de los plaguicidas ácidos en ESI+, arriba se encuentra el cromatograma con la transición 191.9>146 de la Clopiralida y debajo el cromatograma con la transición 199.1>67 del Metaldehído.



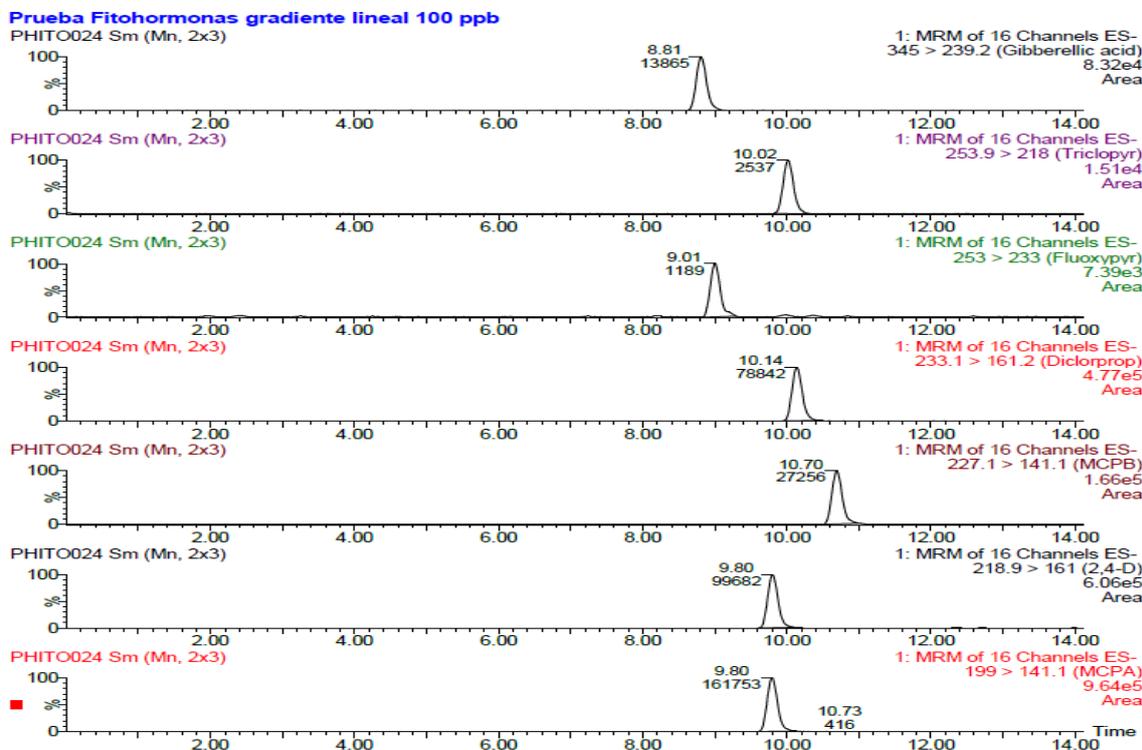
**Figura AXXXI.** Patrones de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de plaguicidas ácidos en ESI-, arriba se encuentra el cromatograma con la transición 345>239.2 del Ácido giberélico, debajo el cromatograma con la transición 253.9>218 del Triclopir, luego el cromatograma con la transición 253>233 del Fluroxipir, a continuación, el cromatograma con la transición 233.1>161.2 del Diclorprop, luego el cromatograma con la transición 227.1>141.1 del MCPB, debajo el cromatograma con la transición 218.9>161 del 2,4-D y por último, el cromatograma con la transición 199>141.1 del MCPA.



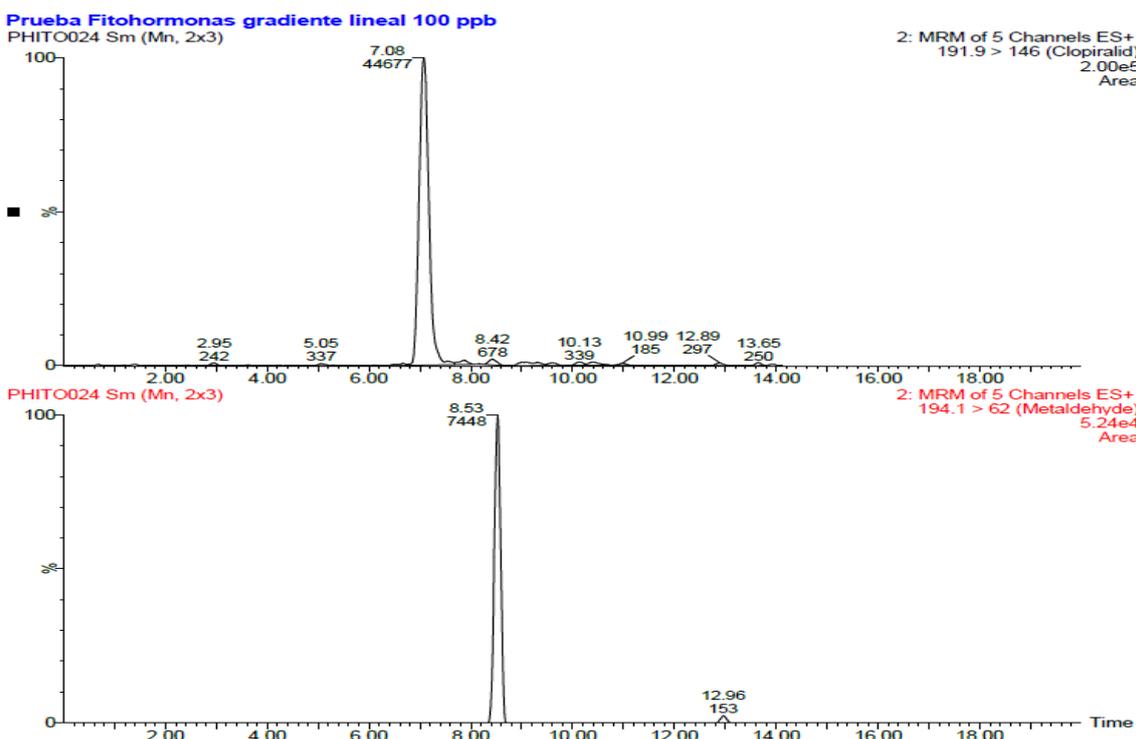
**Figura AXXXII.** Patrones de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  acerca de los plaguicidas ácidos en ESI+, arriba se encuentra el cromatograma con la transición 191.9>146 de la Clopiralida y debajo el cromatograma con la transición 194.1>62 del Metaldehído.



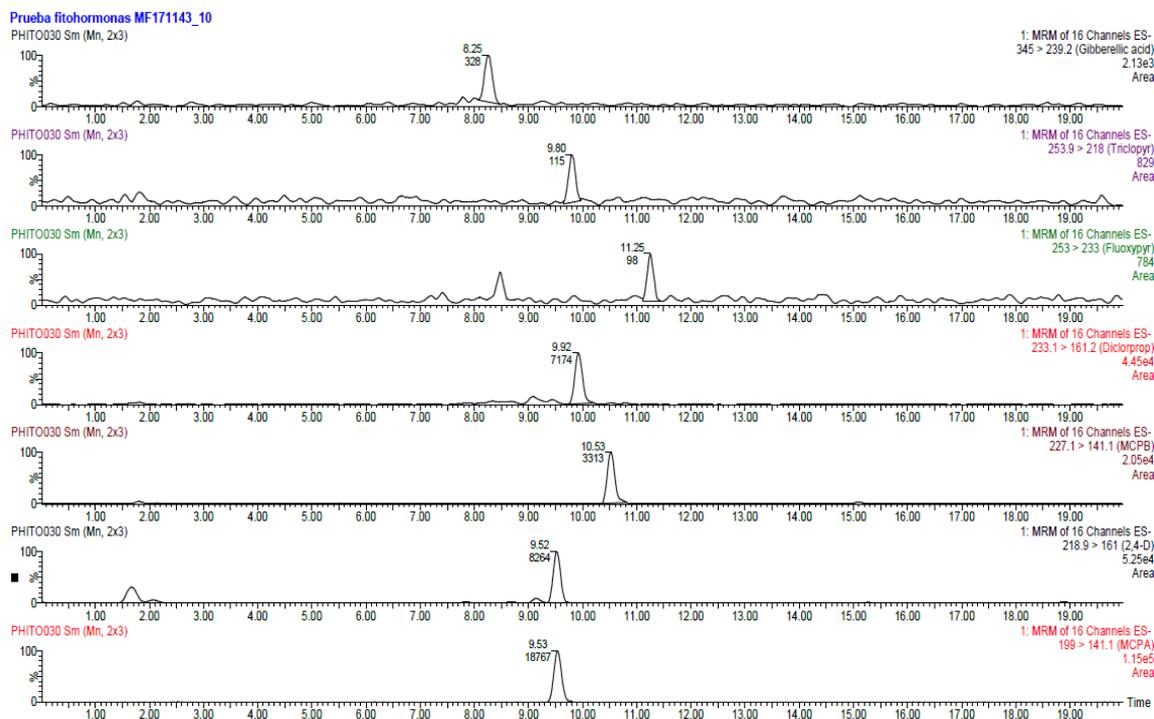
**Figura AXXXIII.** Patrones de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de plaguicidas ácidos en ESI-, arriba se encuentra el cromatograma con la transición 345>239.2 del Ácido giberélico, debajo el cromatograma con la transición 253.9>218 del Triclopir, luego el cromatograma con la transición 253>233 del Fluroxipir, a continuación, el cromatograma con la transición 233.1>161.2 del Diclorprop, luego el cromatograma con la transición 227.1>141.1 del MCPB, debajo el cromatograma con la transición 218.9>161 del 2,4-D y por último, el cromatograma con la transición 199>141.1 del MCPA.



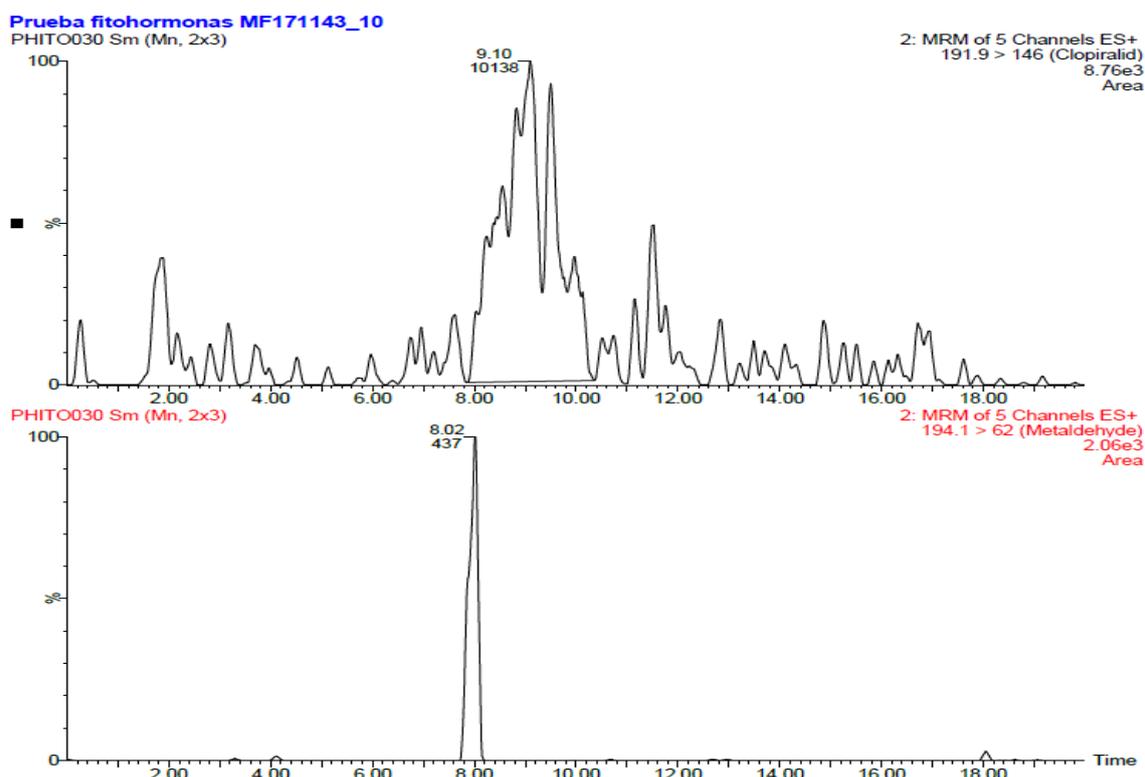
**Figura AXXXIV.** Patrones de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  acerca de los plaguicidas ácidos en ESI+, arriba se encuentra el cromatograma con la transición 191.9>146 de la Clopiralida y debajo el cromatograma con la transición 194.1>106 del Metaldehído.



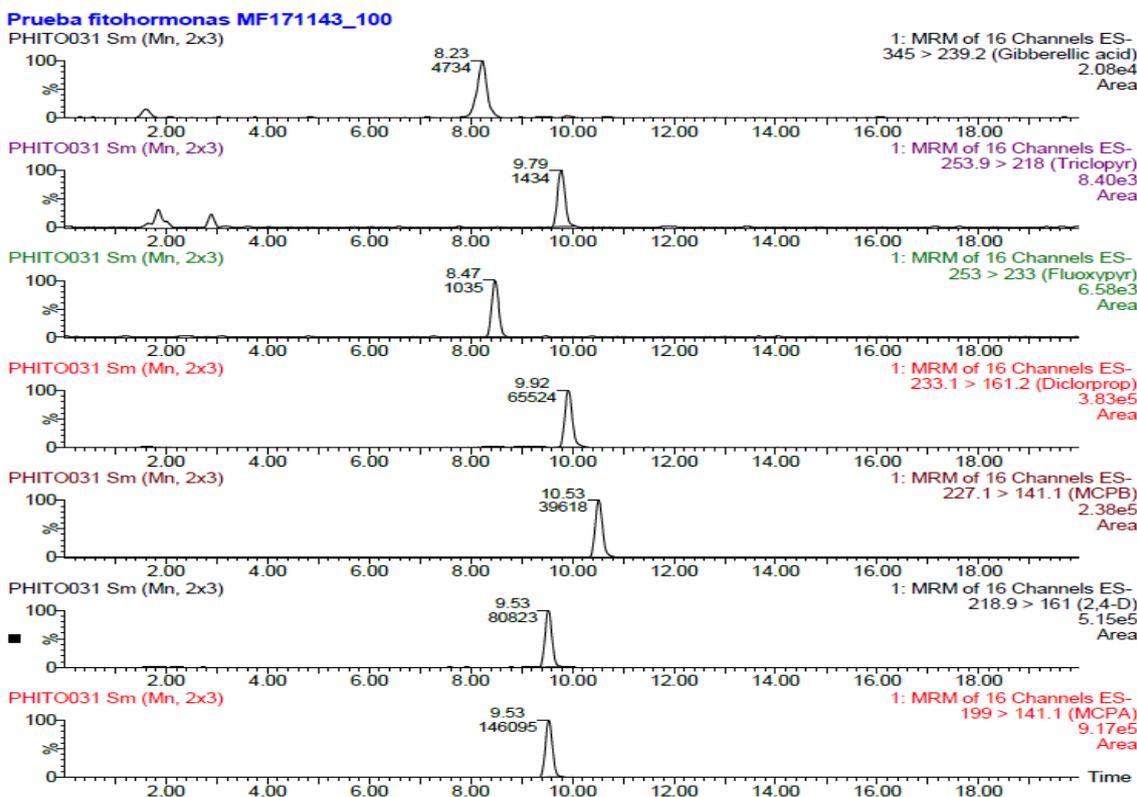
**Figura AXXXV.** Muestra fortificada a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en ESI-, arriba se encuentra el cromatograma con la transición 345>239.2 del Ácido giberélico, debajo el cromatograma con la transición 253.9>218 del Triclopir, luego el cromatograma con la transición 253>233 del Fluroxipir, a continuación, el cromatograma con la transición 233.1>161.2 del Diclorprop, luego el cromatograma con la transición 227.1>141.1 del MCPB, debajo el cromatograma con la transición 218.9>161 del 2,4-D y por último, el cromatograma con la transición 199>141.1 del MCPA.



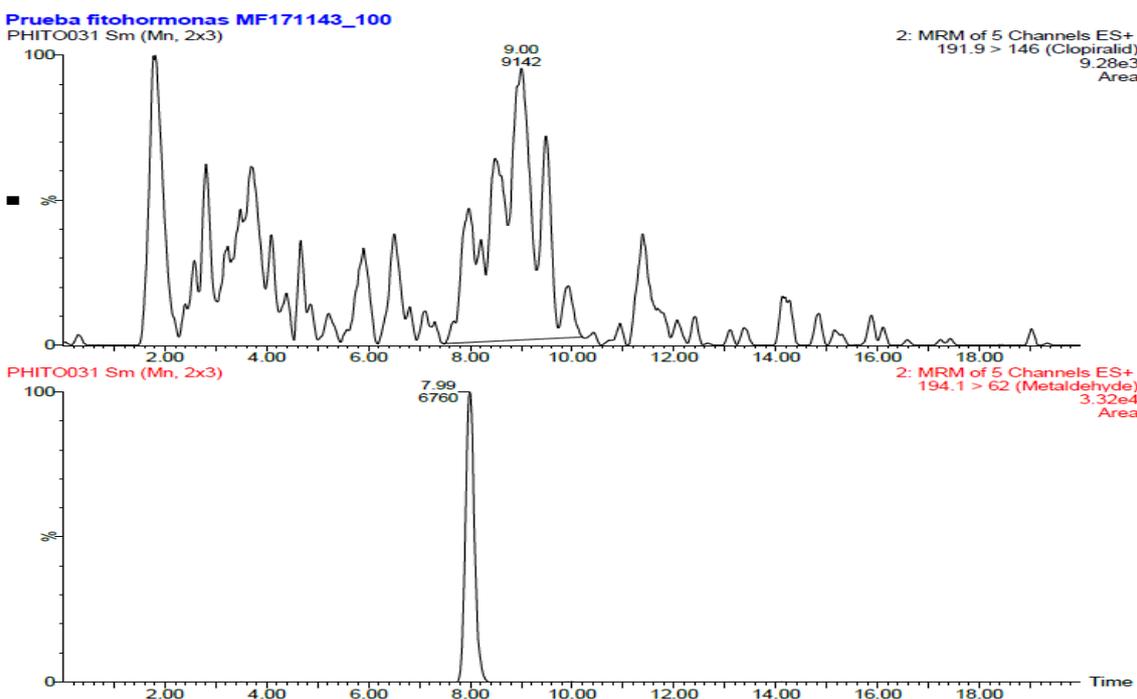
**Figura AXXXVI.** Muestra fortificada a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en ESI+, arriba se encuentra el cromatograma con la transición 191.9>146 de la Clopiralida y debajo el cromatograma con la transición 194.1>62 del Metaldehído.



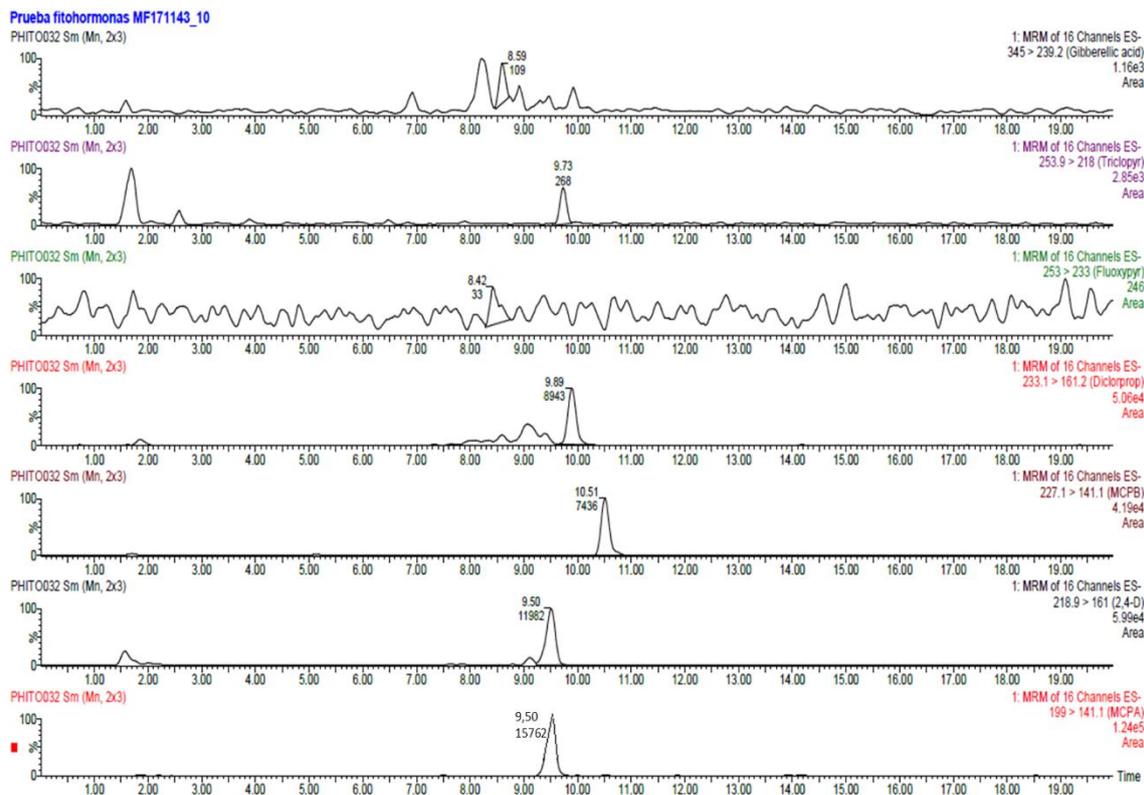
**Figura AXXXVII.** Muestra fortificada a  $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en ESI-, arriba se encuentra el cromatograma con la transición 345>239.2 del Ácido giberélico, debajo el cromatograma con la transición 253.9>218 del Triclopir, luego el cromatograma con la transición 253>233 del Fluroxipir, a continuación, el cromatograma con la transición 233.1>161.2 del Diclorprop, luego el cromatograma con la transición 227.1>141.1 del MCPB, debajo el cromatograma con la transición 218.9>161 del 2,4-D y por último, el cromatograma con la transición 199>141.1 del MCPA.



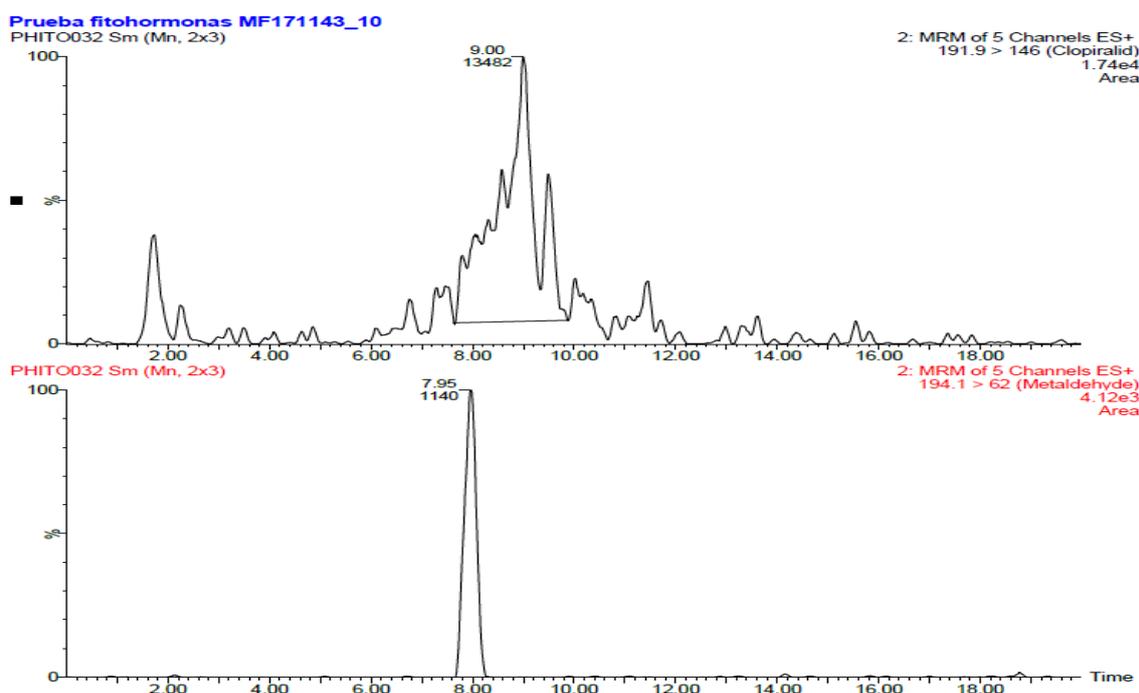
**Figura AXXXVIII.** Muestra fortificada a  $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en ESI+, arriba se encuentra el cromatograma con la transición 191.9>146 de la Clopiralida y debajo el cromatograma con la transición 194.1>62 del Metaldehído.



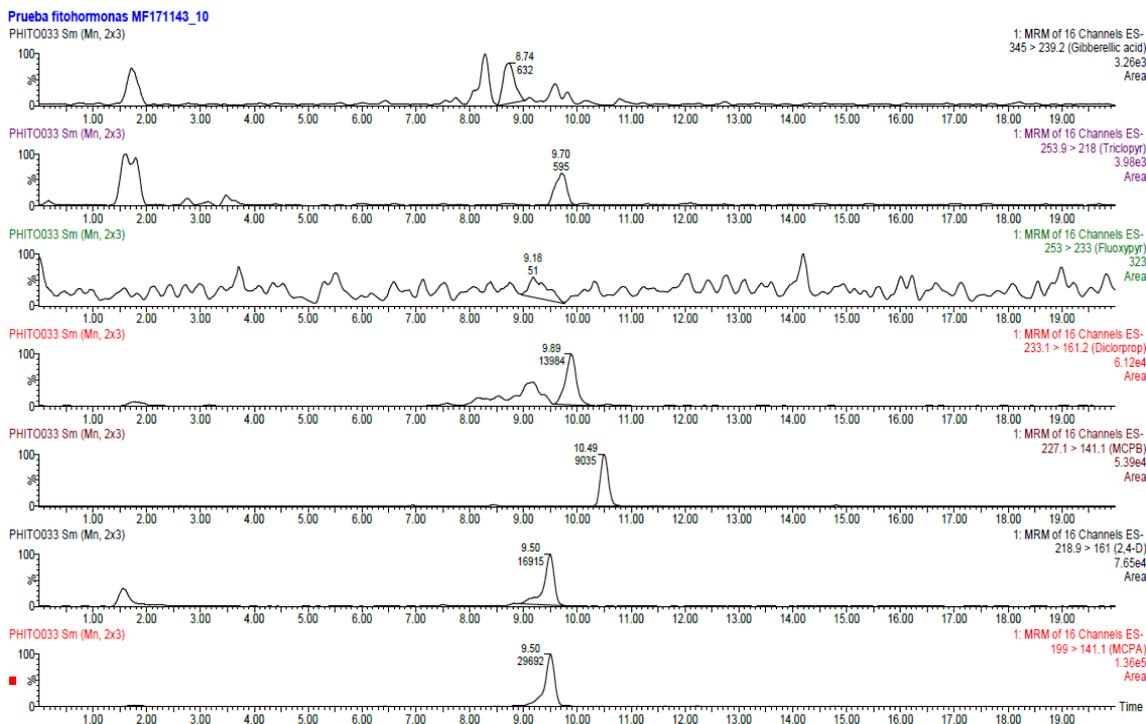
**Figura AXXXIX.** Muestra fortificada a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en ESI- inyectando  $20 \mu\text{L}$ , arriba se encuentra el cromatograma con la transición  $345 > 239.2$  del Ácido giberélico, debajo el cromatograma con la transición  $253.9 > 218$  del Triclopir, luego el cromatograma con la transición  $253 > 233$  del Fluroxipir, a continuación, el cromatograma con la transición  $233.1 > 161.2$  del Diclorprop, luego el cromatograma con la transición  $227.1 > 141.1$  del MCPB, debajo el cromatograma con la transición  $218.9 > 161$  del 2,4-D y por último, el cromatograma con la transición  $199 > 141.1$  del MCPA.



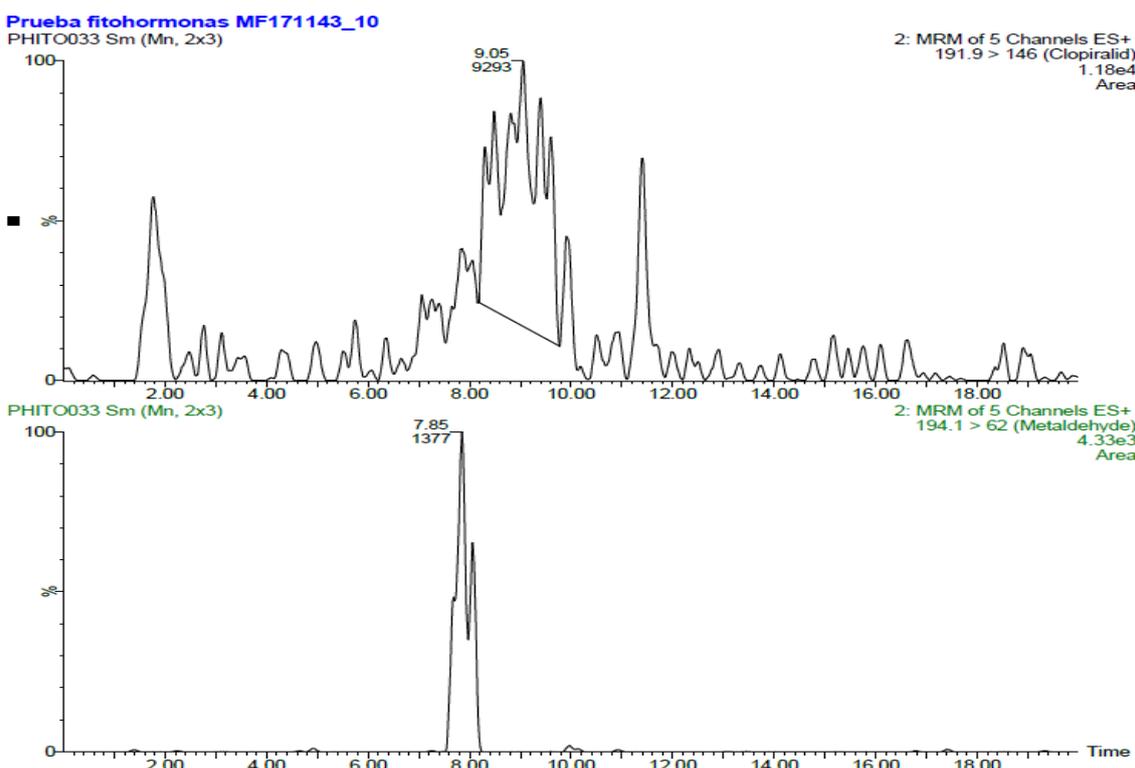
**Figura AXXXX.** Muestra fortificada a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en ESI+ inyectando  $20 \mu\text{L}$ , arriba se encuentra el cromatograma con la transición  $191.9 > 146$  de la Clopiralida y debajo el cromatograma con la transición  $194.1 > 62$  del Metaldehído.



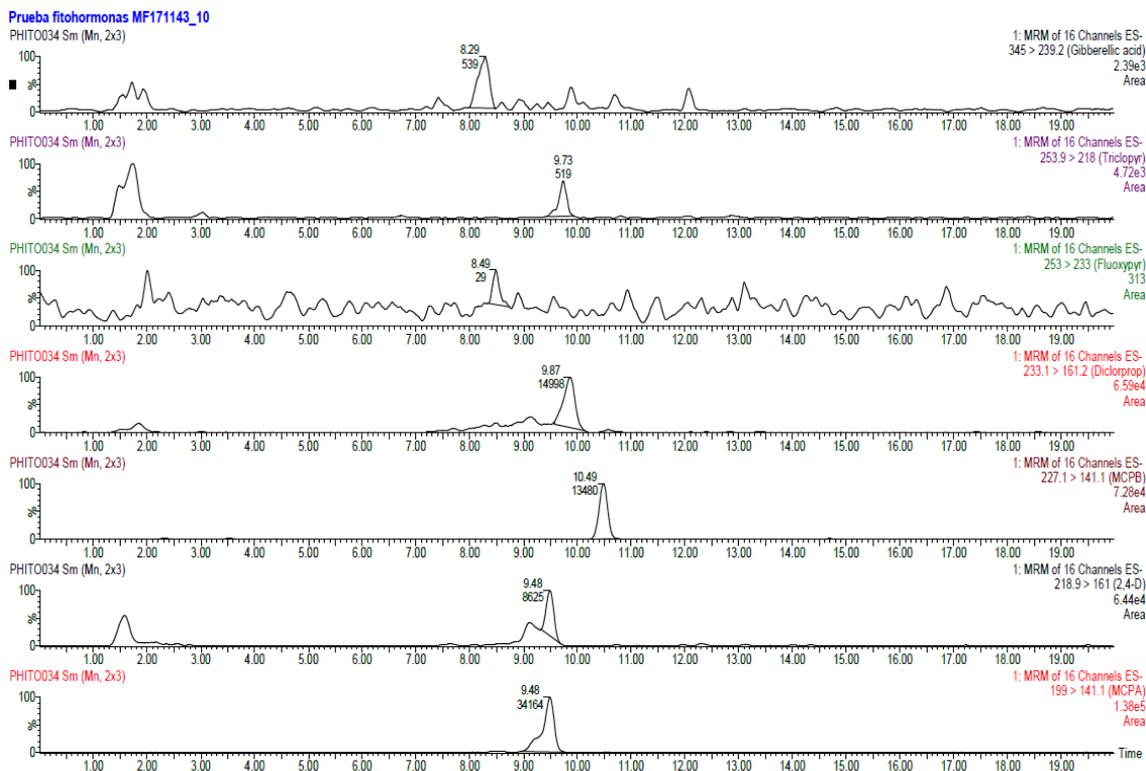
**Figura AXXXXI.** Muestra fortificada a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en ESI- inyectando  $30 \mu\text{L}$ , arriba se encuentra el cromatograma con la transición  $345 > 239.2$  del Ácido giberélico, debajo el cromatograma con la transición  $253.9 > 218$  del Triclopir, luego el cromatograma con la transición  $253 > 233$  del Fluroxipir, a continuación, el cromatograma con la transición  $233.1 > 161.2$  del Diclorprop, luego el cromatograma con la transición  $227.1 > 141.1$  del MCPB, debajo el cromatograma con la transición  $218.9 > 161$  del 2,4-D y por último, el cromatograma con la transición  $199 > 141.1$  del MCPA.



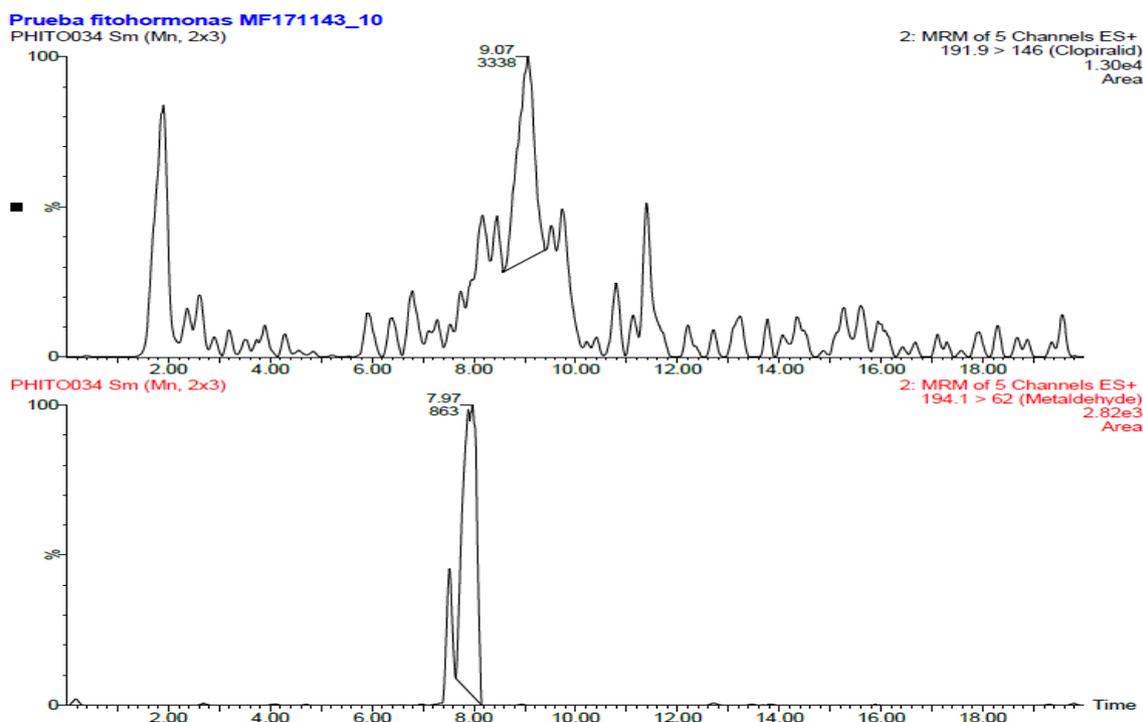
**Figura AXXXXII.** Muestra fortificada a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en ESI+ inyectando  $30 \mu\text{L}$ , arriba se encuentra el cromatograma con la transición  $191.9 > 146$  de la Clopiralida y debajo el cromatograma con la transición  $194.1 > 62$  del Metaldehído.



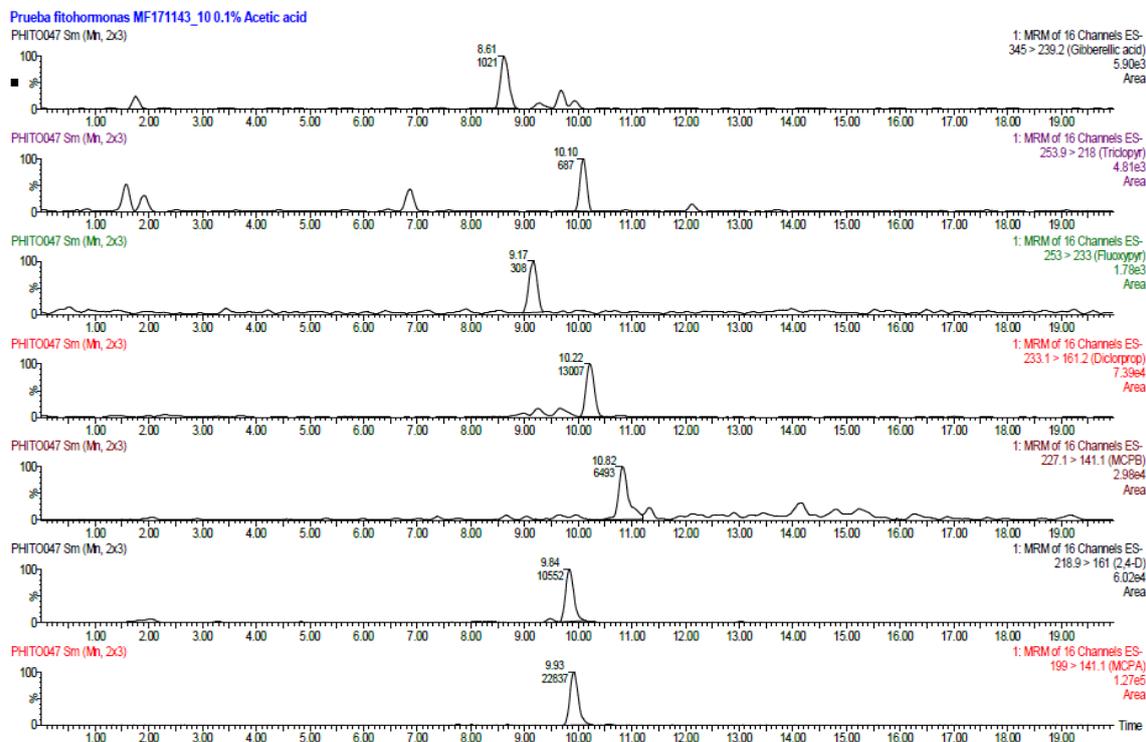
**Figura AXXXXIII.** Muestra fortificada a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en ESI- inyectando  $40 \mu\text{L}$ , arriba se encuentra el cromatograma con la transición  $345 > 239.2$  del Ácido giberélico, debajo el cromatograma con la transición  $253.9 > 218$  del Triclopir, luego el cromatograma con la transición  $253 > 233$  del Fluroxipir, a continuación, el cromatograma con la transición  $233.1 > 161.2$  del Diclorprop, luego el cromatograma con la transición  $227.1 > 141.1$  del MCPB, debajo el cromatograma con la transición  $218.9 > 161$  del 2,4-D y por último, el cromatograma con la transición  $199 > 141.1$  del MCPA.



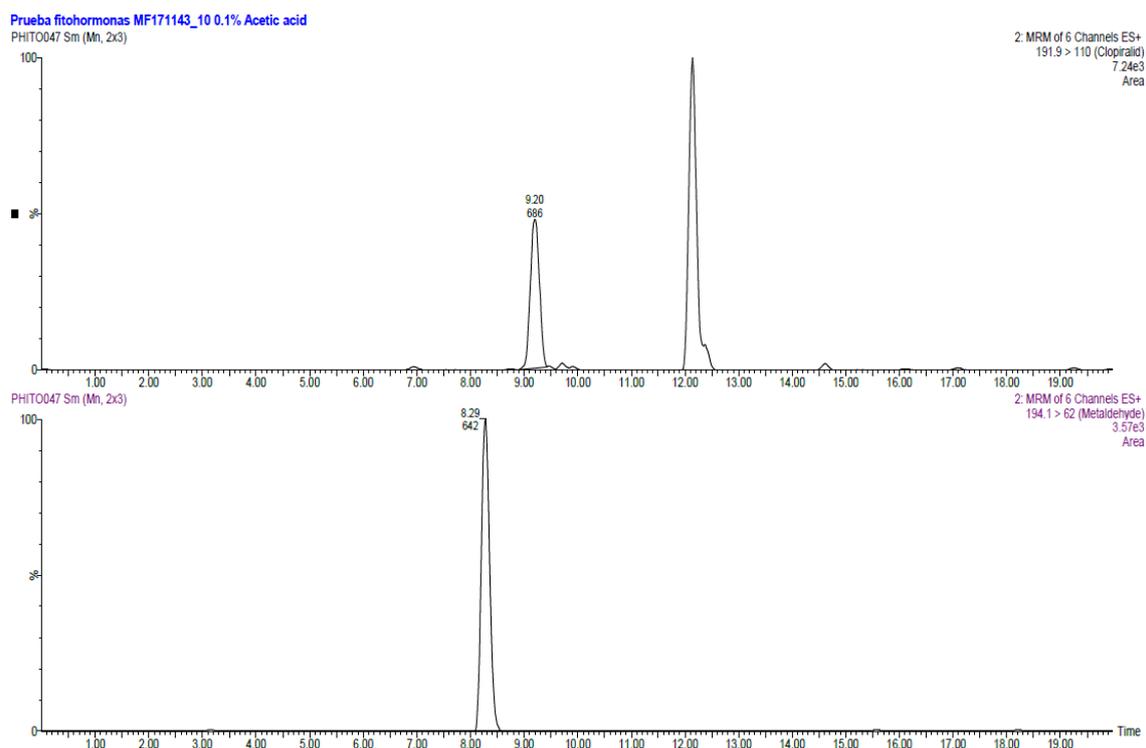
**Figura AXXXXIV.** Muestra fortificada a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en ESI+ inyectando  $40 \mu\text{L}$ , arriba se encuentra el cromatograma con la transición  $191.9 > 146$  de la Clopiralida y debajo el cromatograma con la transición  $194.1 > 62$  del Metaldehído.



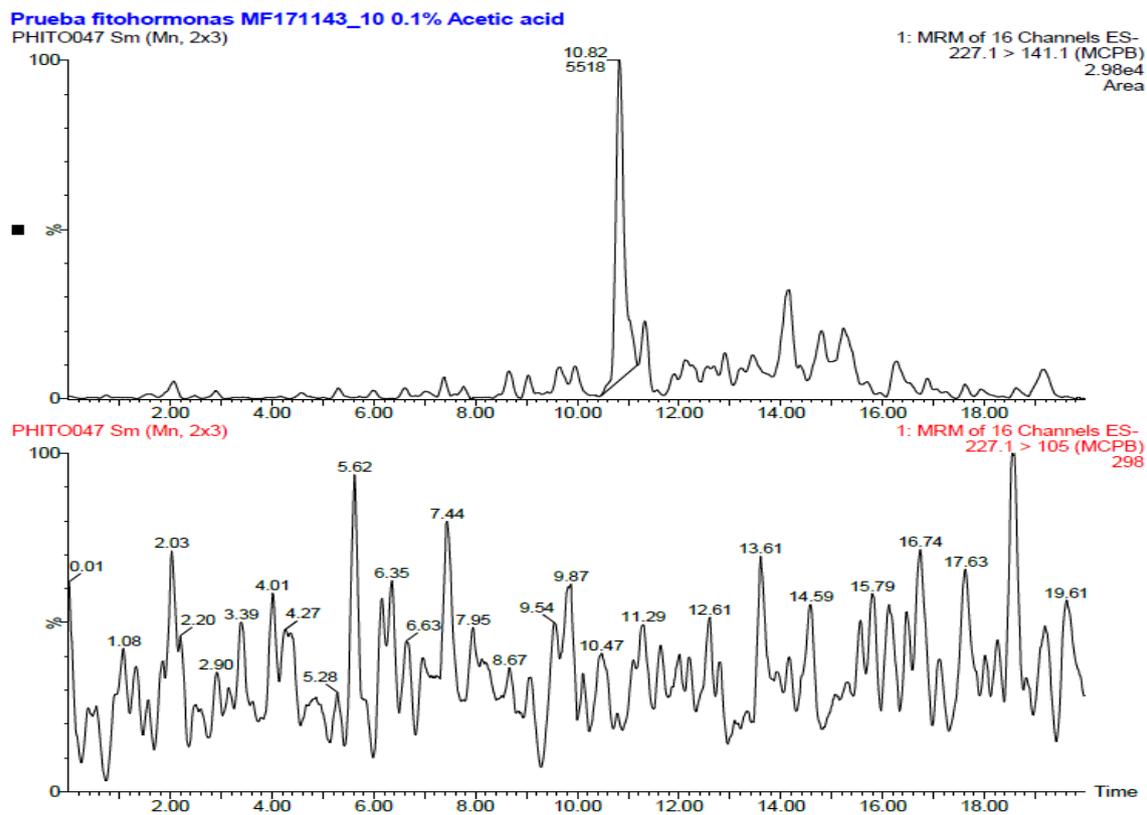
**Figura AXXXXV.** Muestra fortificada a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en ESI- con 0.1 % de Ácido acético en la fase móvil, arriba se encuentra el cromatograma con la transición 345>239.2 del Ácido giberélico, debajo el cromatograma con la transición 253.9>218 del Triclopir, luego el cromatograma con la transición 233.1>161.2 del Diclorprop, luego el cromatograma con la transición 227.1>141.1 del MCPB, debajo el cromatograma con la transición 218.9>161 del 2,4-D y por último, el cromatograma con la transición 199>141.1 del MCPA.



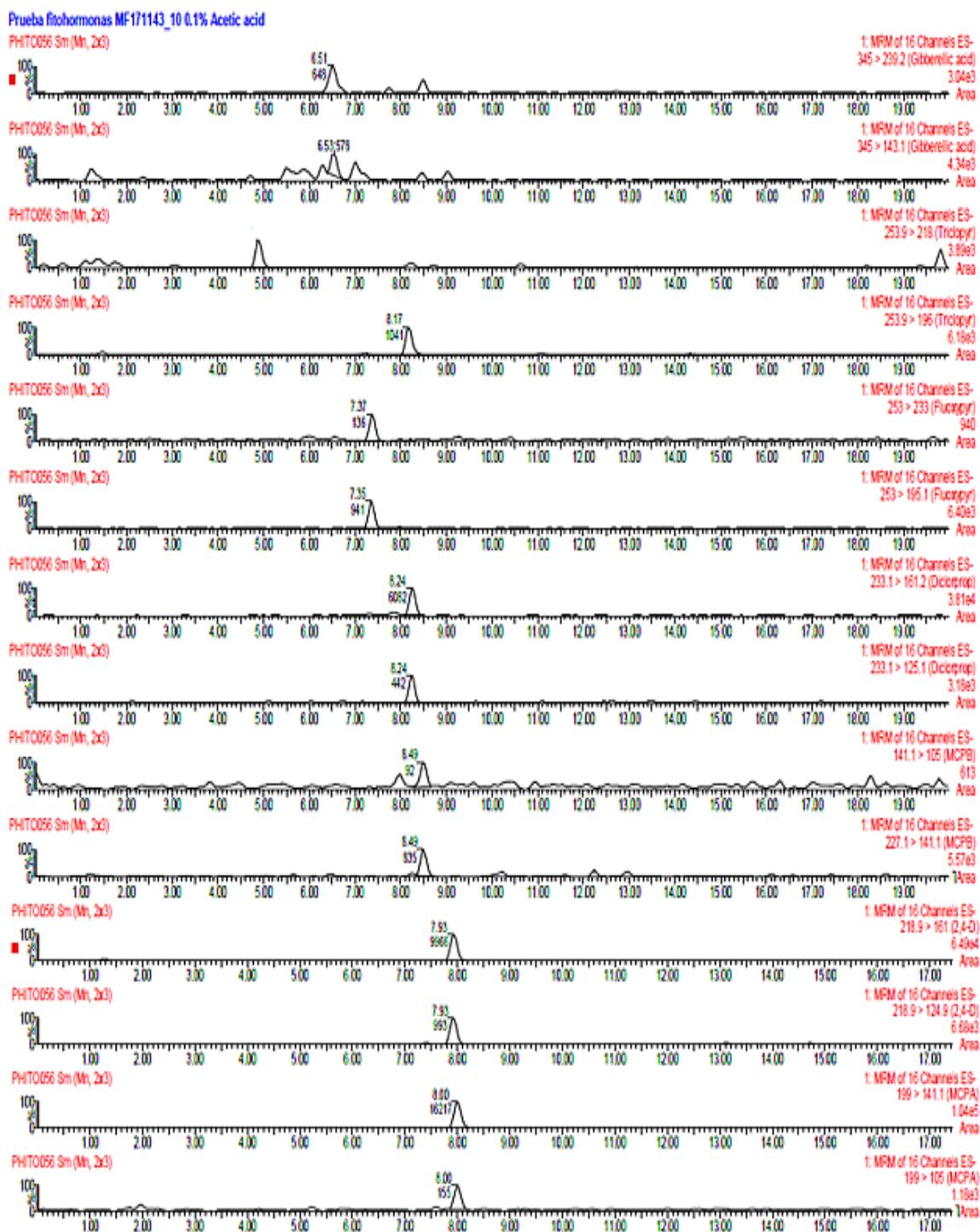
**Figura AXXXXVI.** Muestra fortificada a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en ESI+ con 0.1 % de Ácido acético en la fase móvil, arriba se encuentra el cromatograma con la transición 191.9>146 de la Clopiralida y debajo el cromatograma con la transición 194.1>62 del Metaldehído.



**Figura AXXXXVII.** Cromatograma del MCPB con la transición 227.1>141.1 y debajo el cromatograma del MCPB con la transición 227.1>105.0.



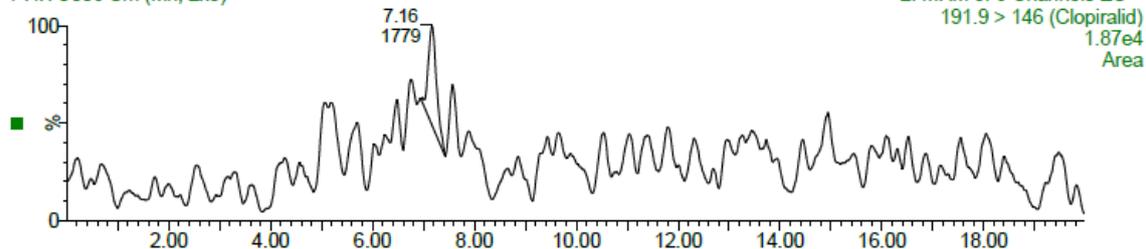
**Figura AXXXXVIII.** Muestra fortificada a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en ESI- con 0.1 % de Ácido acético en la fase móvil, arriba se encuentra el cromatograma con las transiciones: 345>239.2 y 345>143.1, respectivamente del Ácido giberélico, debajo el cromatograma con la transición 253.9>218 y 253.9>196, respectivamente del Triclopir, luego el cromatograma con la transición 253>233 y 253>195.1, respectivamente del Fluroxipir, a continuación, el cromatograma con la transición 233.1>161.2 y 233.1>125.1, respectivamente del Diclorprop, luego el cromatograma con la transición 227.1>141.1 y 141.1>105, respectivamente del MCPB, debajo el cromatograma con la transición 218.9>161 y 218.9>124.9, respectivamente del 2,4-D y por último, el cromatograma con la transición 199>141.1 y 199>105, respectivamente del MCPA.



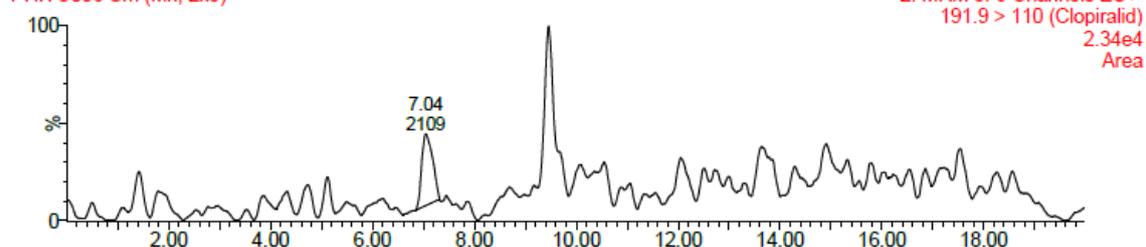
**Figura AXXXXIX.** Muestra fortificada a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en ESI+ con 0.1 % de Ácido acético en la fase móvil, arriba se encuentra el cromatograma con la transición  $191.9 > 146$  y  $191.9 > 110$ , respectivamente de la Clopiralida y debajo el cromatograma con la transición  $194.1 > 62$  y  $194.1 > 106$ , respectivamente del Metaldehído.

**Prueba fitohormonas MF171143\_10 0.1% Acetic acid**

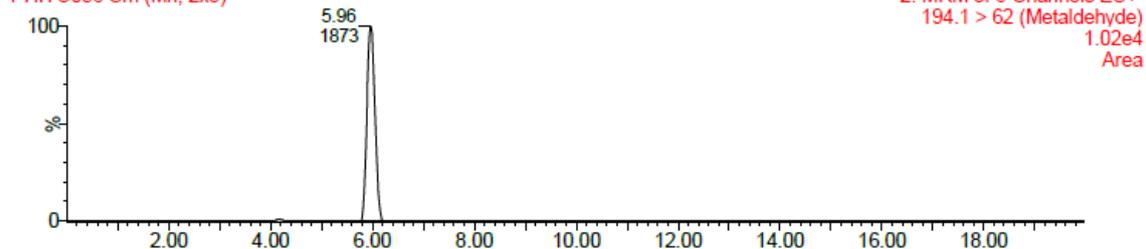
PHITO056 Sm (Mn, 2x3)



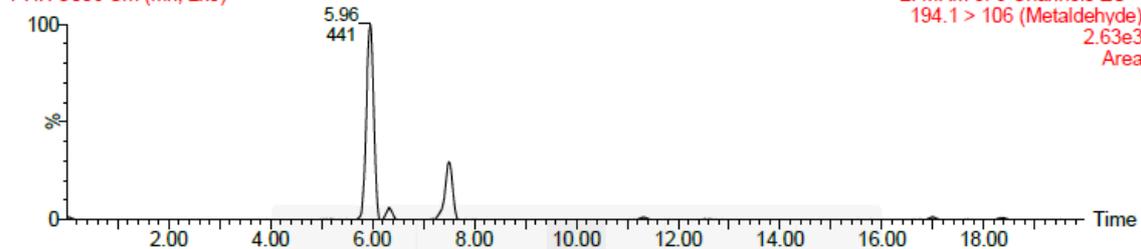
PHITO056 Sm (Mn, 2x3)



PHITO056 Sm (Mn, 2x3)

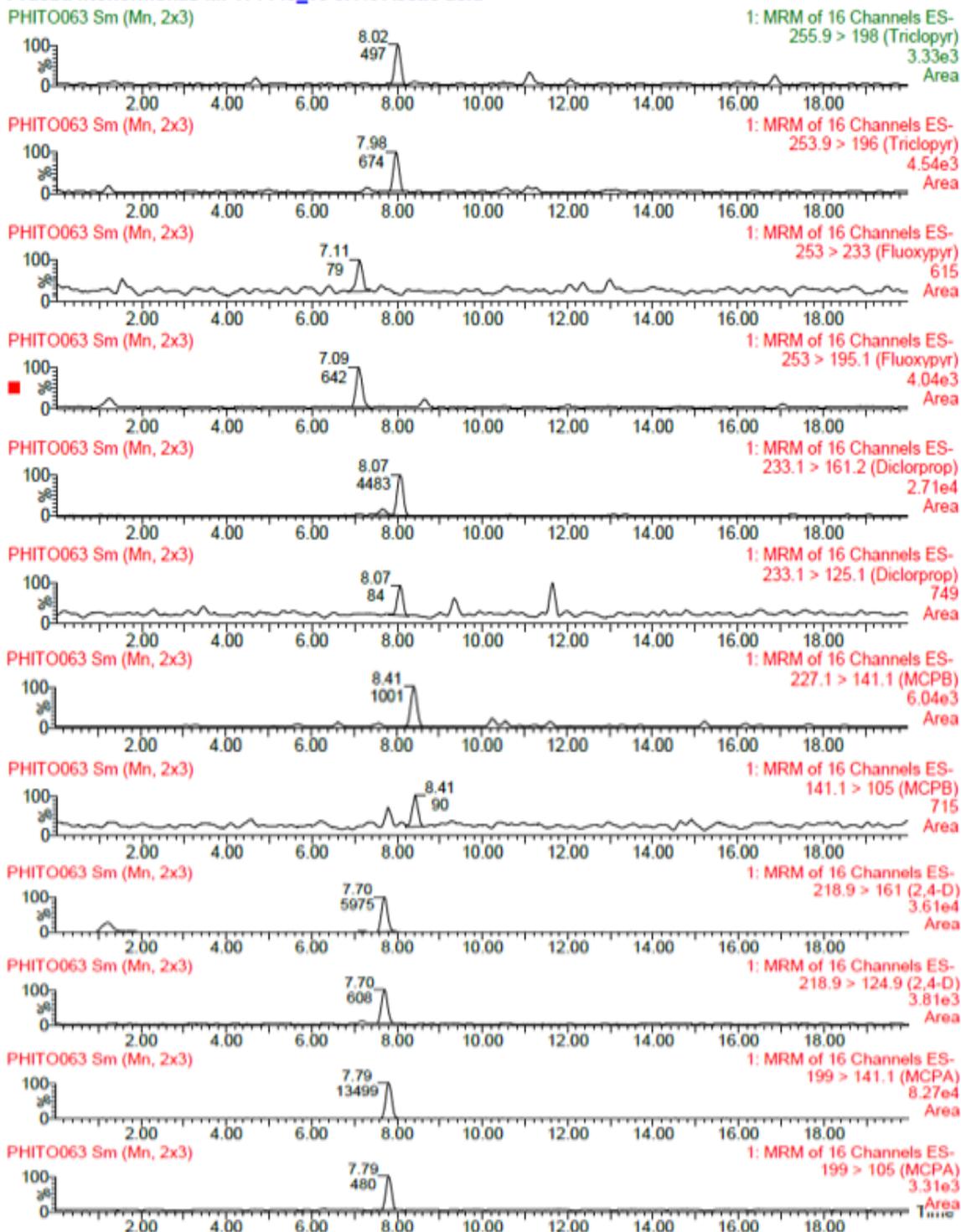


PHITO056 Sm (Mn, 2x3)



**Figura AL.** Muestra fortificada a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en ESI- con 0.1 % de Ácido acético en la fase móvil, arriba se encuentra el cromatograma con la transición 255.9>198 y 253.9>196, respectivamente del Triclopir, debajo el cromatograma con la transición 253>233 y 253>195.1, respectivamente del Fluroxipir, a continuación, el cromatograma con la transición 233.1>161.2 y 233.1>125.1, respectivamente del Diclorprop, luego el cromatograma con la transición 227.1>141.1 y 141.1>105, respectivamente del MCPB, debajo el cromatograma con la transición 218.9>161 y 218.9>124.9, respectivamente del 2,4-D y por último, el cromatograma con la transición 199>141.1 y 199>105, respectivamente del MCPA.

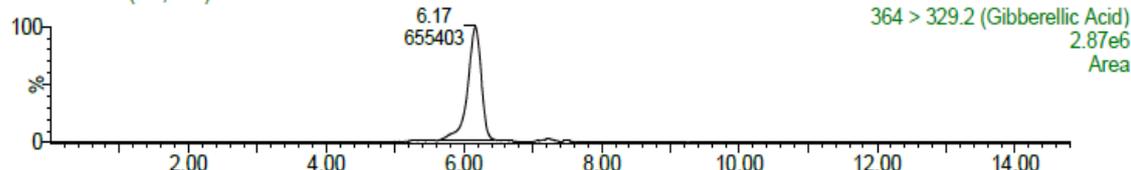
#### Prueba fitohormonas MF171143\_10 0.1% Acetic acid



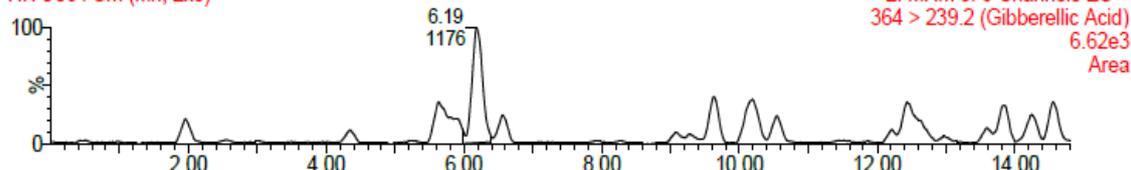
**Figura ALI.** Muestra fortificada a  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en ESI+ con 0.1 % de Ácido acético en la fase móvil, arriba se encuentra el cromatograma con la transición 364>329.2 y 364>239.2, respectivamente del Ácido giberélico, debajo o el cromatograma con la transición 191.9>146 y 191.9>110, respectivamente de la Clopiralida y a continuación, el cromatograma con la transición 194.1>62 y 194.1>106, respectivamente del Metaldehído.

**Prueba fitohormonas MF171143\_10 0.1% Acetic acid**

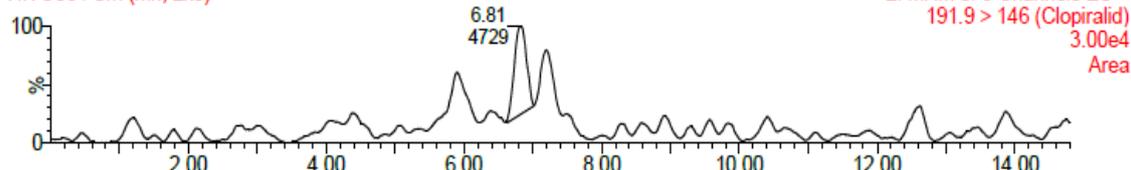
PHITO064 Sm (Mn, 2x3)



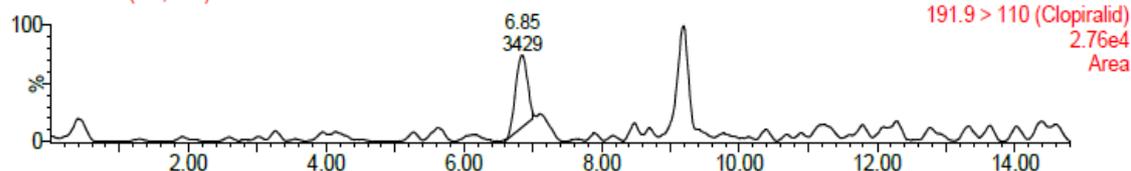
PHITO064 Sm (Mn, 2x3)



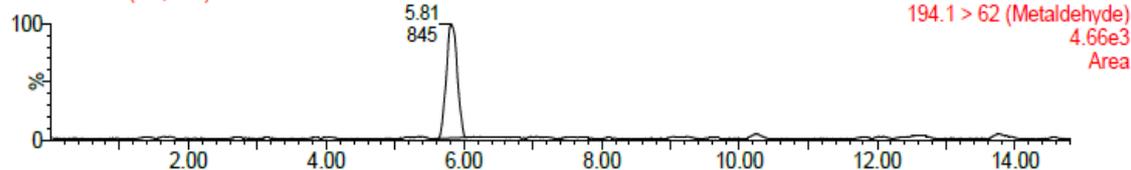
PHITO064 Sm (Mn, 2x3)



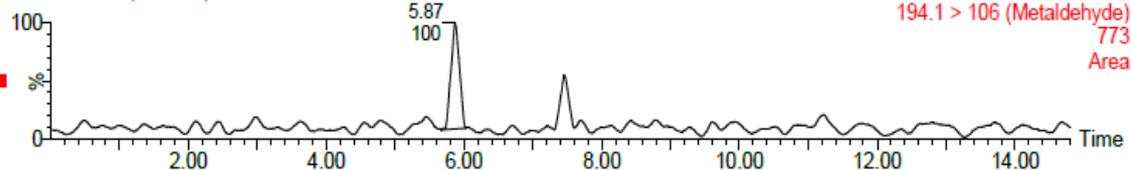
PHITO064 Sm (Mn, 2x3)



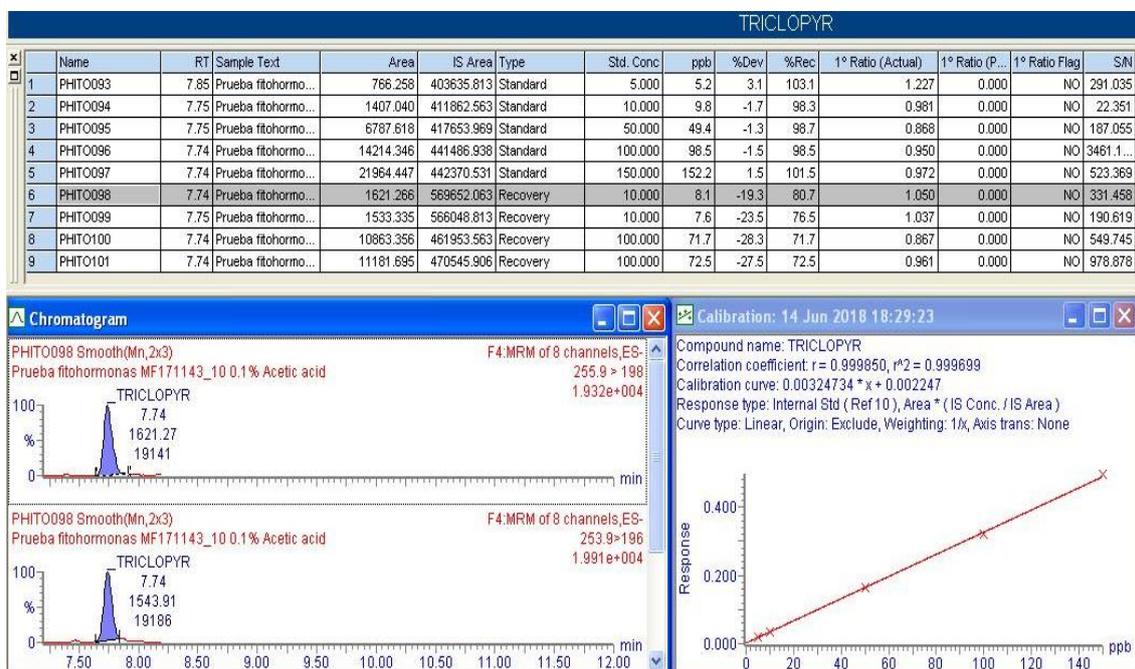
PHITO064 Sm (Mn, 2x3)



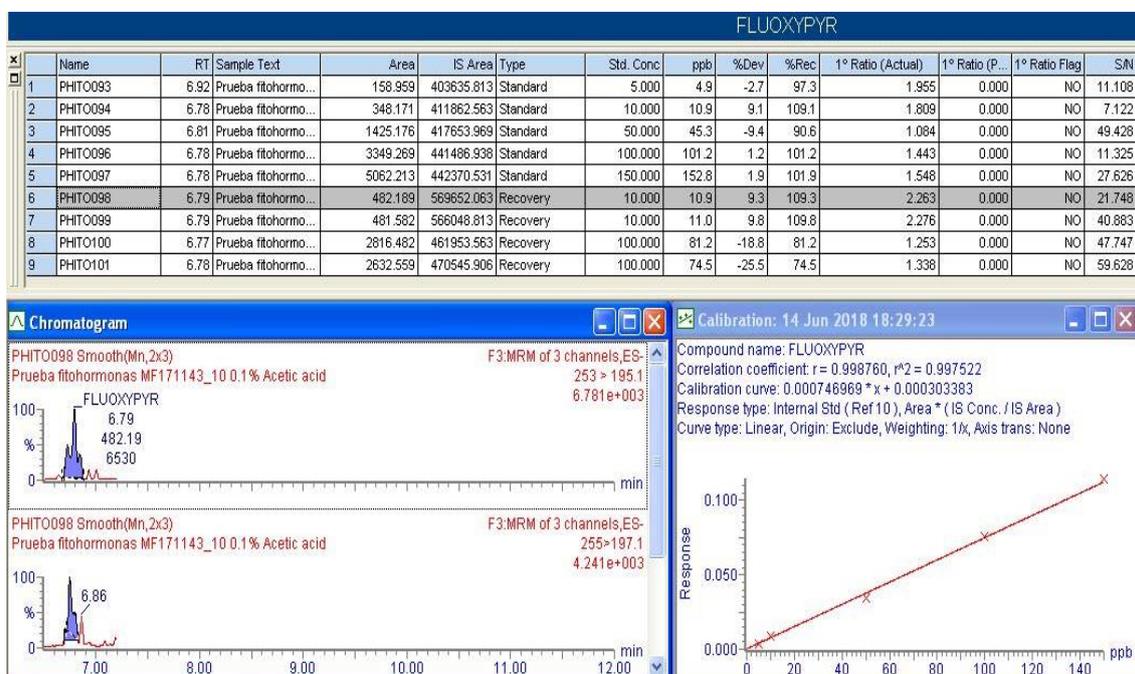
PHITO064 Sm (Mn, 2x3)



**Figura ALII.** Cuantificación mediante recta de calibrado y dos fortificados a 10 y 100  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para el Triclopir. Abajo a la izquierda el cromatograma obtenido para el fortificado a 10  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  con la transición de cuantificación y confirmación, respectivamente. Abajo a la derecha, la representación gráfica de la recta de calibrado.

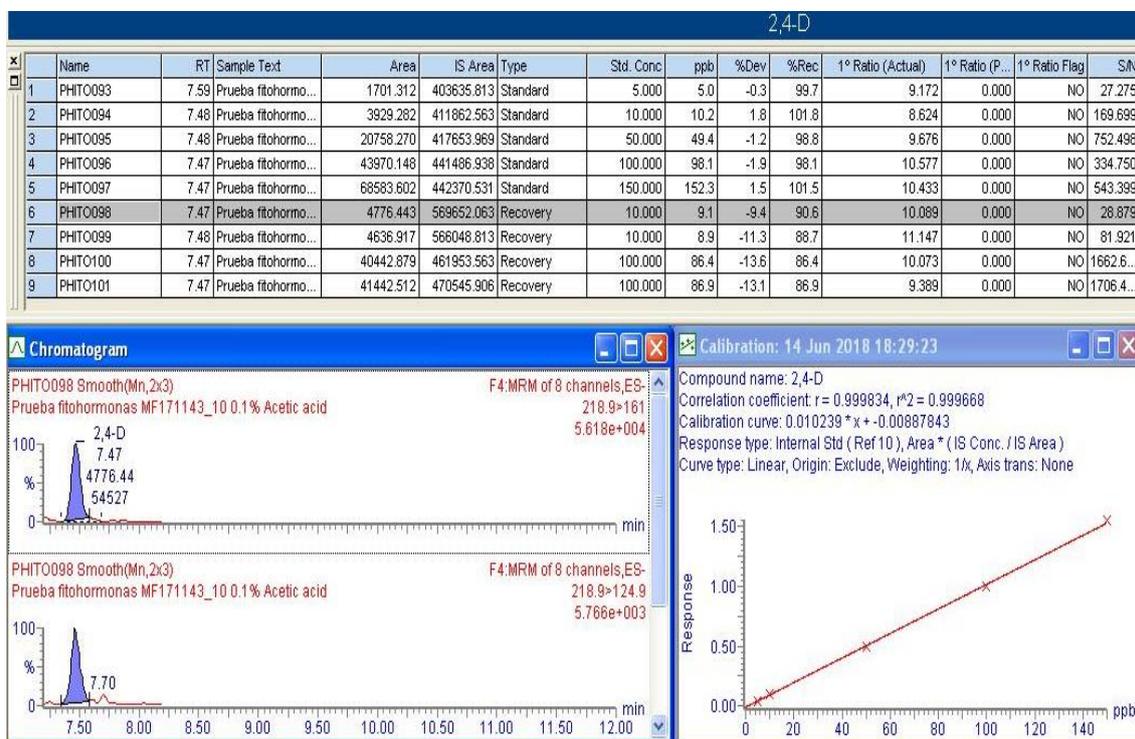


**Figura ALIII.** Cuantificación mediante recta de calibrado y dos fortificados a 10 y 100  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para el Fluroxipir. Abajo a la izquierda el cromatograma obtenido para el fortificado a 10  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  con la transición de cuantificación y confirmación, respectivamente. Abajo a la derecha, la representación gráfica de la recta de calibrado.

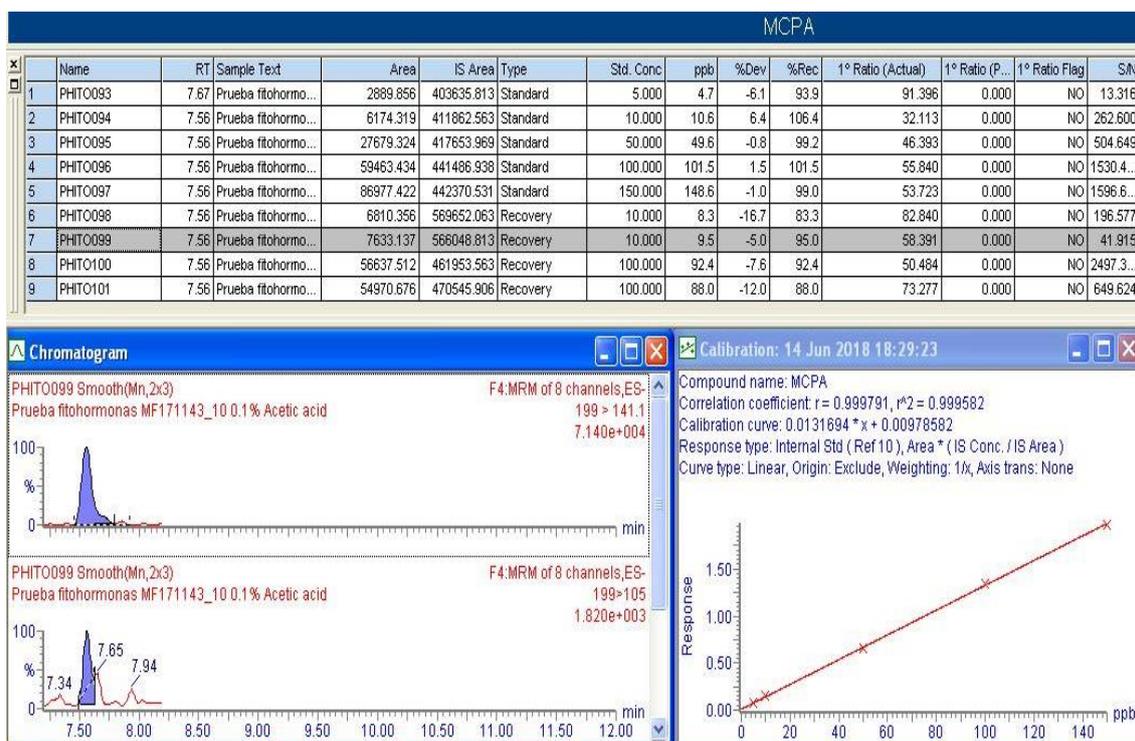




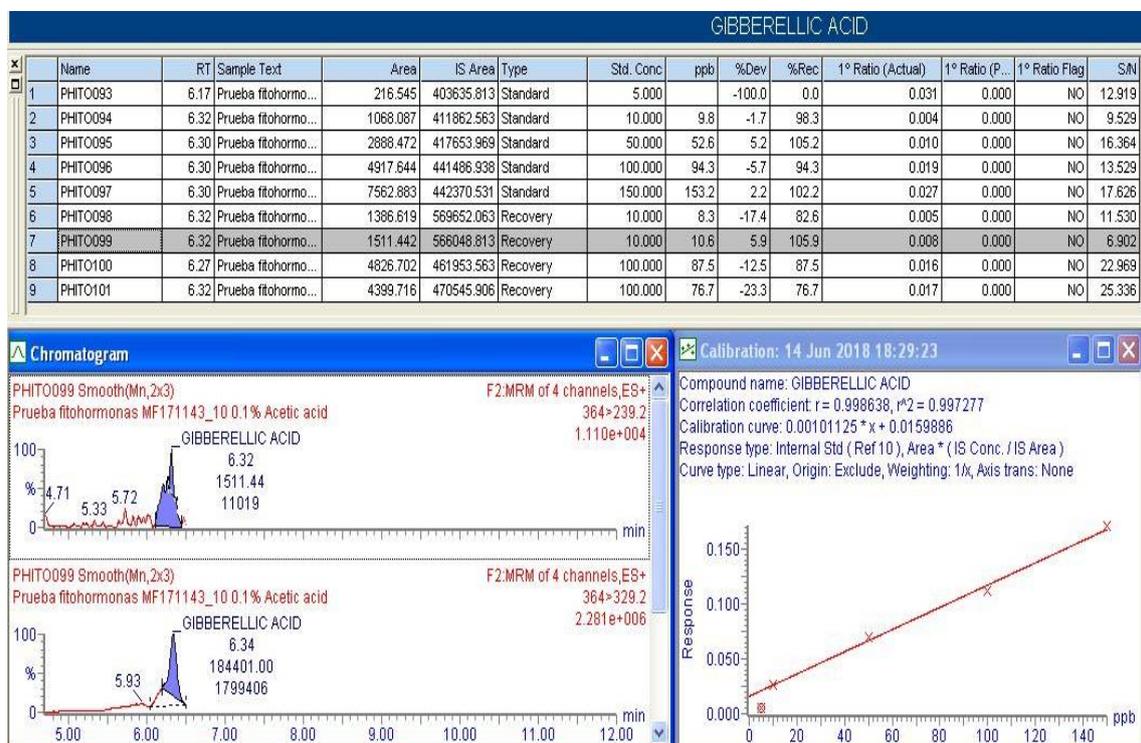
**Figura ALVI.** Cuantificación mediante recta de calibrado y dos fortificados a 10 y 100  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para el 2,4-D. Abajo a la izquierda el cromatograma obtenido para el fortificado a 10  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  con la transición de cuantificación y confirmación, respectivamente. Abajo a la derecha, la representación gráfica de la recta de calibrado.



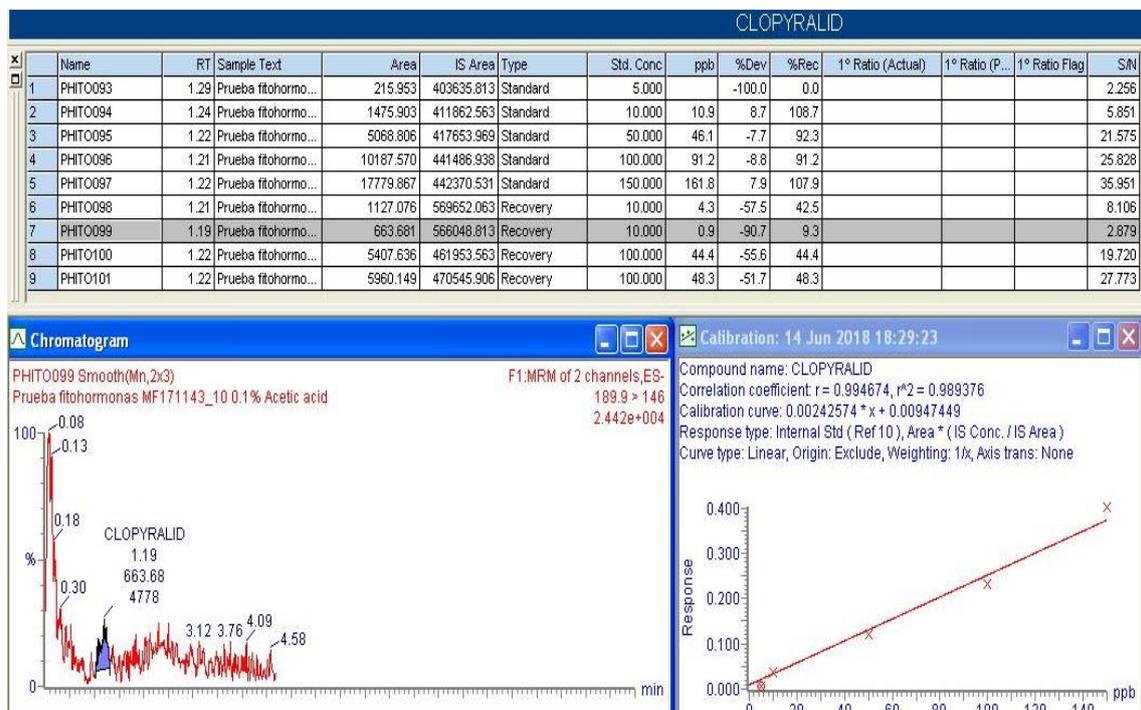
**Figura ALVII.** Cuantificación mediante recta de calibrado y dos fortificados a 10 y 100  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para el MCPA. Abajo a la izquierda el cromatograma obtenido para el fortificado a 10  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  con la transición de cuantificación y confirmación, respectivamente. Abajo a la derecha, la representación gráfica de la recta de calibrado.



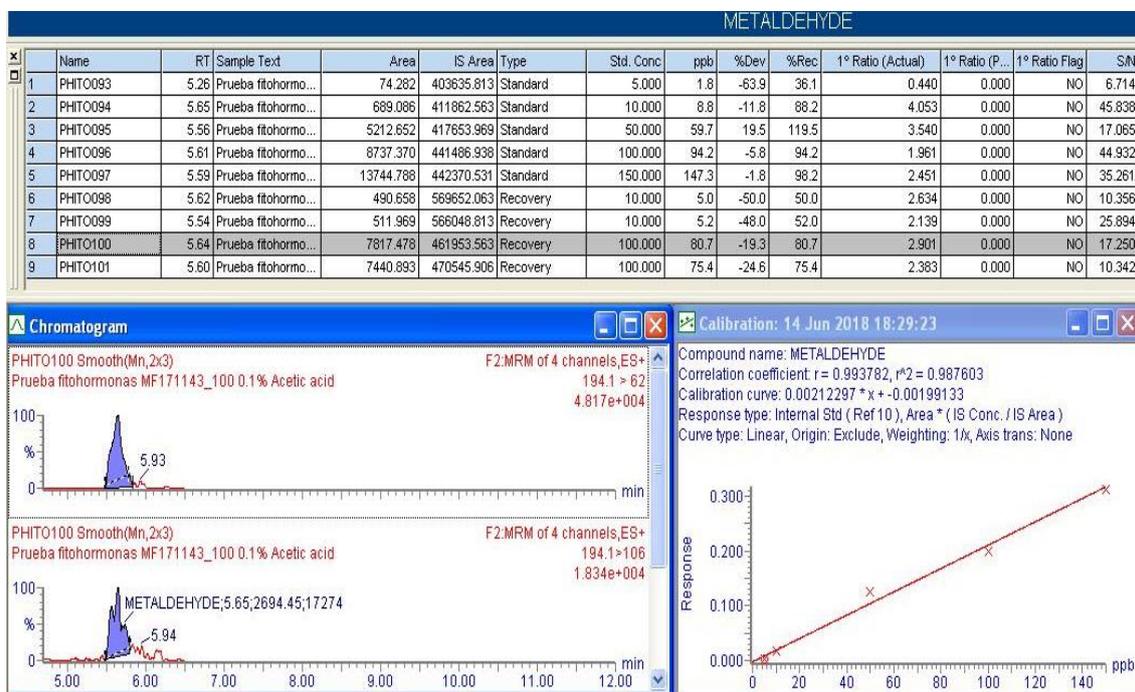
**Figura ALVIII.** Cuantificación mediante recta de calibrado y dos fortificados a 10 y 100  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para el Ácido giberélico. Abajo a la izquierda el cromatograma obtenido para el fortificado a 10  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  con la transición de cuantificación y confirmación, respectivamente. Abajo a la derecha, la representación gráfica de la recta de calibrado.



**Figura ALIX.** Cuantificación mediante recta de calibrado y dos fortificados a 10 y 100  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para la Clopiralida. Abajo a la izquierda el cromatograma obtenido para el fortificado a 10  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  con la transición de cuantificación. Abajo a la derecha, la representación gráfica de la recta de calibrado.



**Figura ALX.** Cuantificación mediante recta de calibrado y dos fortificados a 10 y 100  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para el Metaldehído. Abajo a la izquierda el cromatograma obtenido para el fortificado a 100  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  con la transición de cuantificación y confirmación, respectivamente. Abajo a la derecha, la representación gráfica de la recta de calibrado.



**Figura ALXI.** Cuantificación mediante recta de calibrado y dos fortificados a 10 y 100  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para el patrón interno (Trifenilfosfato). Abajo a la izquierda el cromatograma obtenido para el fortificado a 100  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  con la transición de cuantificación. Abajo a la derecha, la representación gráfica de la recta de calibrado.

