



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**ANÁLISIS DE RESIDUOS
DE PLAGUICIDAS EN
MANGO MEDIANTE
CROMATOGRAFÍA DE
LÍQUIDOS ACOPLADA A
ESPECTROMETRÍA DE
MASAS**

Alumna: Rocío Gay González

Junio, 2023



Trabajo Fin de Grado

ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN MANGO MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Alumna: Rocío Gay González

Jaén, Junio, 2023

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. OBJETIVO.....	1
3. INTRODUCCIÓN	2
3.1. La problemática de los residuos de plaguicidas en alimentos y su legislación.....	2
3.2. Metodología para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos	4
3.3. Cromatografía líquida para el análisis de plaguicidas en alimentos	6
3.4. La espectrometría de masas de alta resolución y el uso de bases de datos para la identificación de residuos de plaguicidas en alimentos..	8
3.5. Consideraciones en la cuantificación de plaguicidas en muestras de alimentos mediante LC-MS.....	16
3.5.1. <i>Efecto Matriz</i>	<i>16</i>
3.5.2. <i>Calibración y rango de linealidad</i>	<i>17</i>
3.6. Caso de estudio: Determinación de residuos de plaguicidas en mango 18	
3.6.1. <i>El mango</i>	<i>18</i>
3.6.2. <i>Antecedentes en la determinación de residuos de plaguicidas en mango.....</i>	<i>21</i>
4. EXPERIMENTAL.....	25
4.1. Materiales y reactivos	25
4.2. Tratamiento de muestra.....	25
4.3. Instrumentación.....	26
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
5.1. <i>Suspect screening</i> de plaguicidas en mango.....	28
5.1.1. <i>Resultados del análisis de las muestras de mango</i>	<i>32</i>
5.2. Análisis cuantitativo de los residuos de plaguicidas.....	34
6. CONCLUSIONES	37
7. BIBLIOGRAFÍA.....	39

1. RESUMEN

En este trabajo, se ha estudiado la presencia de residuos de plaguicidas en mango empleando cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de alta resolución. Esta aproximación permite la medida de masas exactas de iones para identificar especies sin necesidad de emplear patrones. Se ha usado un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo/tiempo de vuelo (UHPLC-QTOF-MS) con fuente de ionización de *electrospray* en modo positivo. Se empleó un método derivado del *QuEChERS*, basado en extracción sólido-líquido con acetonitrilo para la extracción de los plaguicidas de las muestras. Para realizar la detección de plaguicidas basada en medidas de masas exactas (*suspect screening*), se ha elaborado una base de datos con 416 analitos, considerando las masas de los iones precursores ($[M+H]^+$) para propiciar el análisis cualitativo de los plaguicidas empleando el software *Agilent MassHunter*. En total, se han identificado un total de 6 plaguicidas en las muestras analizadas, que se han confirmado empleando patrones puros.

ABSTRACT

In this study, the presence of trace residues of pesticides in mango has been evaluated using liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry, which enables accurate mass measurements to obtain elemental compositions allowing analyte identification. A UHPLC-QTOF-MS system with electrospray ionization operated in the positive ion mode was used combined with solvent extraction with acetonitrile (QuEChERS-based) sample preparation. The pesticides were detected using a suspect screening approach based on accurate mass measurements of selected pesticides. A database of 416 pesticides was prepared using the protonated molecules of the studied compounds, using MassHunter Qualitative Software. Up to 6 pesticides were identified, and further confirmation was carried out with neat solvents.

2. OBJETIVO

El principal objetivo de este Trabajo Fin de Grado es estudiar la presencia de plaguicidas en mango.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. La problemática de los residuos de plaguicidas en alimentos y su legislación

A pesar de que el uso de los plaguicidas comenzó con el desarrollo de la agricultura, no fue hasta 1920 cuando se empezaron a sintetizar en el laboratorio, lo cual hizo que se extendiera su aplicación (Bedmar, 2011). La FAO define los plaguicidas como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias con ingredientes químicos o biológicos destinados a repeler, destruir o controlar cualquier plaga o a regular el crecimiento de las plantas” (FAO y OMS, 2015). Se pueden agrupar atendiendo a una amplia variedad de criterios, algunos de los cuales se recogen en la tabla 3.1 (Akhase *et al.*, 2008).

Tabla 3.1. Resumen de las posibles clasificaciones de los plaguicidas (Akhase *et al.*, 2008).

Criterio	Tipos
Toxicidad	Extremadamente peligrosos, muy peligrosos, moderadamente peligrosos...
Plaga	Acaricidas, alguicidas, bactericidas, herbicidas, insecticidas, fungicidas...
Composición química	Carbamatos, organoclorados, organofosforados, piretroides...
Modo de entrada	Sistemáticos, de contacto, fumigantes, repelentes...
Modo de acción	Venenos físicos, protoplásmicos, respiratorios, nerviosos...
Tipo de formulación	Sólidos (cebos, polvos), líquidos (aerosoles, fluidos), gaseosos...
Origen	Naturales, químicos

Su uso a gran escala resulta imprescindible para satisfacer las necesidades de la población en auge. Se estima que en 2050 habrá 9.700 millones de habitantes en la Tierra, suponiendo un crecimiento de más del 30%. Este hecho exigirá un aumento del 70% de la producción de alimentos en países desarrollados. El 20% del mismo será debido a la expansión del terreno agrícola. En consecuencia, surge la necesidad del empleo de plaguicidas con el objetivo de lograr la intensificación de los cultivos (Foro de Alto Nivel de Expertos FAO, 2009).

El uso inadecuado de plaguicidas, normalmente asociado a malas prácticas agrícolas, plantea una serie de problemas medioambientales, entre los que figura la salud humana. Los plaguicidas contaminan el agua, el suelo y la atmósfera, además de

acumularse en los cultivos, pudiendo pasar a los alimentos, como muestra la figura 3.1 (Fenik *et al.*, 2011). Su destino final depende de diversos factores, entre los que se incluyen las condiciones medioambientales y la tasa de crecimiento de los cultivos (López-Ruiz, 2020).

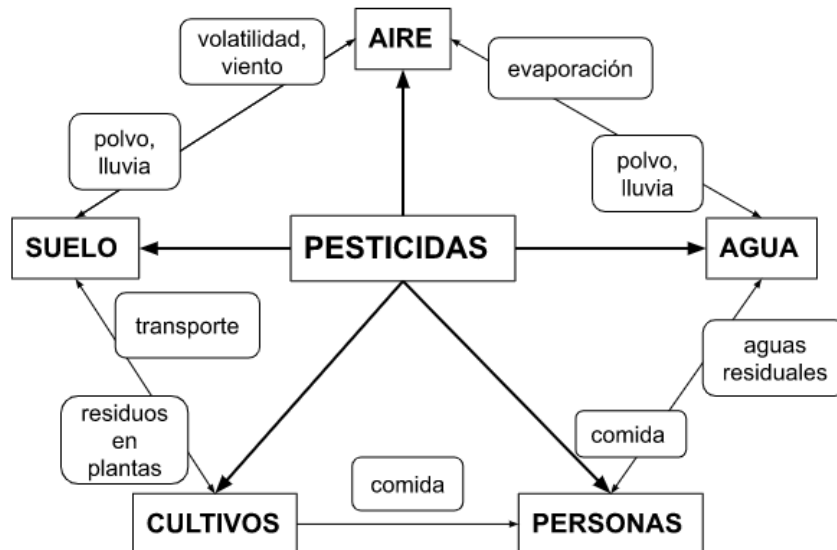


Figura 3.1. El ciclo de los plaguicidas en la naturaleza (Fenik *et al.*, 2011).

En consecuencia, el ser humano queda expuesto a ellos por diversas vías: ingestión, inhalación o absorción dérmica. Entre los efectos observados en personas por la ingesta de alimentos contaminados con plaguicidas destacan disfunciones neurológicas y conductuales, problemas reproductivos y hormonales, acompañados del desarrollo de tumores (Yura *et al.*, 2021). Por ello, los agricultores han de usar cantidades adecuadas de plaguicidas, cumpliendo con las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), además de evitar el uso de plaguicidas no regulados.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) trabajan juntas para garantizar la inocuidad de los alimentos que consumimos, ya que la Seguridad Alimentaria constituye uno de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) para 2030. Como resultado, el Codex Alimentarius recopila una serie de normas alimentarias y establece límites máximos de residuos (LMR) de plaguicidas en alimentos. Además, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) define los residuos de plaguicidas como “*cantidades mensurables de sustancias activas*

(sustancias químicas utilizadas para proteger a las plantas contra enfermedades y plagas) y sus metabolitos o productos de degradación que se pueden encontrar en los cultivos cosechados o en los productos alimenticios de origen animal.” A nivel nacional, la mayoría de los países desarrollados cuentan con organismos competentes que velan por la Seguridad Alimentaria, como FDA (EE.UU.), PMRA (Canadá), FSAI (Irlanda), JSFM (Japón) y AESAN (España). Sin embargo, los países de la Unión Europea se rigen por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Reglamento (CE) n° 396/2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal. Dicho reglamento sufre continuas modificaciones, con el fin de proteger a los consumidores. Actualmente, están recogidos los LMRs para 656 plaguicidas, en 381 productos alimentarios, así como directrices para llevar a cabo su análisis. Dichos LMRs se pueden consultar online en una base oficial y específica, que se actualiza continuamente (Comisión Europea, 2023).

3.2. Metodología para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos

El tratamiento de la muestra para el análisis multi-residuo de plaguicidas en frutas y verduras es de gran importancia, pudiendo afectar en gran medida a la calidad del análisis. Resulta imprescindible considerar las dos principales problemáticas que afectan a estas medidas: la alta complejidad y diversidad de matrices, así como las bajas concentraciones a determinar (Fenik *et al.*, 2011). Además, la muestra ha de ser representativa y homogénea, siendo su composición química lo más parecida posible a la media de la población analizada.

El tratamiento suele iniciarse con la preparación de muestra, que puede incluir procesos como el lavado o la trituración, considerando las partes de las matrices a las que se les aplica el LMR y que se deben analizar, reguladas en el Codex (CCPR, 2010). El siguiente paso consiste en la extracción de los analitos, que se transfieren desde la matriz original a un disolvente de extracción. Se persigue el menor consumo de disolvente posible. Para la elección del mismo, se consideran aspectos como su toxicidad o la solubilidad de los analitos en él, siendo frecuente el empleo de

acetonitrilo, acetato de etilo, diclorometano, metanol y tolueno (Wahab *et al.*, 2022). Se suele recurrir a equipos de agitación automática para mejorar la reproducibilidad y asegurar el contacto íntimo entre fases. Además, la adición de sales anhidras puede favorecer la transferencia de analitos de mayor polaridad al disolvente, por una reducción de la solubilidad en fase acuosa como consecuencia del aumento de su fuerza iónica. Este efecto se conoce como *salting-out* (Štajnbaher y Zupančič-Kralj, 2003; Perestrelo *et al.*, 2019).

La coextracción de otros compuestos de la matriz es frecuente en los métodos multiresiduo, ya que los parámetros de extracción suelen ser muy generales dada la heterogeneidad de los analitos y su variedad de propiedades fisicoquímicas. Estos compuestos coextraídos se denominan interferentes y se caracterizan por afectar al análisis, por ejemplo, generando efecto matriz o aumentando el límite de cuantificación. En consecuencia, la última etapa del tratamiento de muestras vegetales suele ser una etapa de limpieza o *clean up*. Normalmente, se lleva a cabo con sorbentes que permitan eliminación moderadamente selectiva de los interferentes.

Hay diversos métodos de tratamiento de muestra para el análisis multiresiduo, como el método Luke (y sus variantes), el método del acetato de etilo o el método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) (Ferrer, 2017). Este último es el más común. Se comenzó a implementar en el siglo XXI, con sucesivas mejoras y modificaciones (Anastassiades y Lehotay, 2003).

En el método QuEChERS se distinguen, fundamentalmente, dos etapas. La primera de ellas consiste en una extracción simple con acetonitrilo, en presencia de sales, originalmente MgSO_4 anhidro y NaCl , para favorecer el efecto *salting-out*. Se pueden usar otras sales si se recurre a métodos tamponados en el caso de analitos sensibles al pH. La segunda etapa consiste en la limpieza del extracto o *clean up*, mediante dSPE (extracción en fase sólida dispersiva). Para ello, se toma un volumen determinado de sobrenadante de la etapa anterior, adicionando sal anhidra (para la eliminación del agua) y un sorbente según el tipo de muestra y los posibles interferentes: el carbón grafitizado (GCB) retiene pigmentos; la amina primaria-

secundaria (PSA) elimina compuestos orgánicos (Anastassiades y Lehotay, 2003; Uclés *et al.*, 2018; Dubey *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2018); C₁₈ retiene compuestos hidrofóbicos (Sol *et al.*, 2018). En algunos casos, resulta de interés emplear una combinación de dichos sorbentes para obtener resultados óptimos (Martínez-Piernas *et al.*, 2018; Mohapatra y Lekha, 2016). Tras la limpieza, se lleva a cabo una centrifugación y se analiza el extracto directamente o se reconstituye en otro disolvente apto para el análisis (Ferrer, 2017). El proceso queda recogido en la figura 3.2.

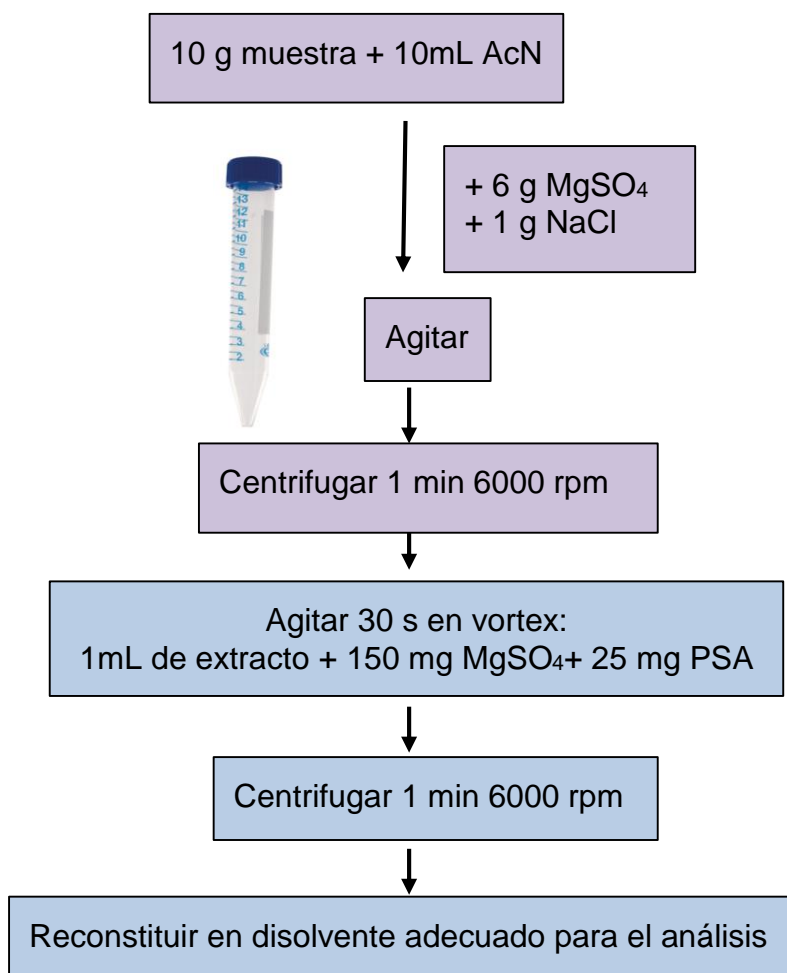


Figura 3.2. Esquema de las etapas del método QuEChERS original (Ferrer, 2017).

3.3. Cromatografía líquida para el análisis de plaguicidas en alimentos

La etapa final del análisis de los plaguicidas en alimentos consiste en la separación, identificación y cuantificación de dichos analitos. Al tratarse de un grupo muy heterogéneo de compuestos, la técnica empleada dependerá de sus propiedades

fisicoquímicas, siendo más usadas la cromatografía líquida (LC) y la cromatografía de gases (GC). Habitualmente, en ambas técnicas, las columnas cromatográficas se acoplan a un espectrómetro de masas (MS) como detector. Como resultado, la capacidad de identificación es mejor, al usar espectros de masas y tiempos de retención. También aumenta la sensibilidad respecto a los detectores UV o de fluorescencia (Alder *et al.*, 2006). La elección de la técnica de análisis empleada implica considerar factores como la polaridad de los plaguicidas, su punto de ebullición, su solubilidad en determinados disolventes o los requerimientos legislativos, entre otros (Raina, 2011).

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) se emplea para analitos volátiles. Por ello, los plaguicidas han de ser de bajo peso molecular o fácilmente derivatizables. Es la opción más común para el análisis de plaguicidas menos polares, entre los que están los organoclorados y los organofosforados (Raina, 2011). Por contra, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) resulta más adecuada para el análisis de compuestos con mayor polaridad, como carbamatos y fenilureas (Raina, 2011). La necesidad de analizar simultáneamente un amplio número de plaguicidas y sus metabolitos (la mayoría de ellos polares, ya que se ha demostrado recientemente que son más respetuosos con el medioambiente por su facilidad de degradación (Pérez-Ortega, 2015)), el escaso tratamiento de muestra requerido y la reducción del tiempo de análisis ha llevado a LC-MS a ser la técnica de análisis multiresiduo más usada. Posibilita la detección, identificación y cuantificación de residuos de plaguicidas en alimentos, proporcionando información estructural de los analitos (Stachniuk y Fornal, 2016).

Hoy en día, es común separar los analitos con columnas de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) o de ultra alta resolución (UHPLC), según el tamaño de partícula de la fase estacionaria. En ambos casos, se inyecta un volumen pequeño de muestra (varios microlitros) en una fase móvil. Esta es bombardeada continuamente a través de una columna, donde está la fase estacionaria, como muestra la figura 3.3. Los analitos interactúan con ella en función de diversos parámetros, separándose según la intensidad de dichas interacciones: cuanto menores sean, antes eluyen los compuestos de interés y menor es el tiempo de permanencia en la columna, o tiempo

de retención. Para los analitos de interés, el tiempo de retención ha de ser, como mínimo, el doble del tiempo muerto o tiempo que tarda un compuesto en atravesar la columna sin interactuar con ella, con una tolerancia de ± 0.1 min (Comisión Europea, 2020). Se trabaja en fase inversa con gradiente de elución, lo cual implica una fase móvil de polaridad creciente: primero eluyen los analitos más polares, seguidos de los de polaridad media y los analitos menos polares son los últimos en salir de la columna. La elución en modo isocrático es menos frecuente (Chung y Lam, 2012). Además, la adición de un modificador orgánico volátil (ácidos orgánicos, sales de amonio o combinaciones de ambos) puede mejorar la eficiencia tanto de la separación como de la detección. La fase estacionaria apolar por excelencia es octadecilsilano (C_{18}), siendo octilsilano (C_8) menos usada. Las fracciones eluidas llegan a la fuente de ionización, desde la que se introducen en el espectrómetro de masas, donde tiene lugar la detección.

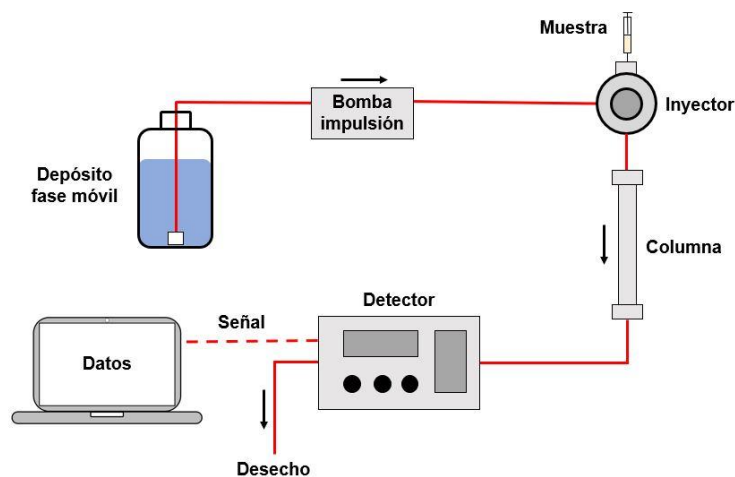


Figura 3.3. Instrumentación HPLC (ApuntesDe, 2022).

3.4. La espectrometría de masas de alta resolución y el uso de bases de datos para la identificación de residuos de plaguicidas en alimentos

La espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) supone un gran avance en cuanto al análisis no dirigido de plaguicidas ya que la espectrometría de masas de baja resolución (LRMS), solo hacía posible la identificación de analitos para los que se disponía de un patrón analítico (*target analysis*). La HRMS es una técnica que

permite el estudio de analitos desconocidos, mediante comparación de espectros con softwares específicos. Se basa en la determinación de masas exactas de iones de especies individuales en una muestra, proporcionando información sobre su naturaleza, composición y estructura. En consecuencia, la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS) es una de las técnicas usadas por excelencia para la determinación de trazas de plaguicidas específicos y sus metabolitos en matrices complejas (López-Ruiz, 2020; Lacorte y Fernández-Alba, 2006). Normalmente, el análisis multirresiduo de plaguicidas en alimentos suele incluir entre 200 y 450 analitos (Pérez-Ortega *et al.*, 2016).

Se ioniza una cantidad ínfima de muestra, principalmente mediante con electrospray (ESI) o ionización química a presión atmosférica (APCI), cuyas características se recogen en la tabla 3.2 (Stachniuk y Fornal, 2016).

Tabla 3.2. Características principales de las fuentes de ionización a presión atmosférica (Adaptado de Stachniuk y Fornal, 2016).

ESI	APCI
<ul style="list-style-type: none"> • Analitos sin límite de peso molecular • Analitos de polaridad media-alta • Compuestos termolábiles • Mayor sensibilidad • Técnica más usada 	<ul style="list-style-type: none"> • Peso molecular analitos < 1000 Da • Analitos de polaridad baja • Compuestos termoestables • Menor efecto matriz • Menor formación aductos

En el analizador, los iones sometidos a un campo eléctrico, de radiofrecuencia y/o magnético y se separan según su cociente masa/carga (m/z), antes de llegar al detector. La combinación de varios analizadores o espectrometría de masas en tándem (MS/MS) conlleva un aumento de la selectividad y la sensibilidad porque se determina el cociente m/z de los iones producto tras seleccionar un ion precursor y someterlo a un proceso de fragmentación en una cámara de colisión. Algunas combinaciones destacables de analizadores son: triple cuadrupolo (QqQ), cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF) y cuadrupolo-trampa lineal (Q-Trap) (Stachniuk y Fornal, 2016; Wahab *et al.*, 2022; Gómez-Ramos *et al.*, 2013; Lacorte y Fernández-Alba, 2006). Por otro lado, el analizador Orbitrap es una trampa de iones electrostática, que

usa la transformada de Fourier para obtener el espectro de masas. Permite trabajar en *full scan* y con muy alta resolución. El acoplamiento de Orbitrap a la cromatografía de líquidos resulta ser una técnica muy potente en la actualidad (Makarov y Scigelova, 2010). Además, el Orbitrap también se puede acoplar con otros analizadores (Lin *et al.*, 2015).

Los analizadores se caracterizan por su resolución o capacidad para diferenciar componentes de masa parecida. También es importante considerar la exactitud o error de masa (MA, por sus siglas en inglés). Esta se define como la diferencia relativa entre el valor de *m/z* experimental (M_{exp}) y el valor de *m/z* teórico (masa monoisotópica, M_{teo}), en relación al valor de este último. Las masas se suelen expresar en Dalton (Da), y el error de masa, en partes por millón (ppm) (Gareth Brenton y Ruth Godfrey, 2010). En el error de masas, se incluye el signo. La expresión se refleja en la figura 3.4. El error de masa elegido también depende de la relación *m/z* de los analitos (Holcapek *et al.*, 2012).

$$MA(\text{ppm}) = \frac{M_{exp}(Da) - M_{teo}(Da)}{M_{teo}(Da)} \times 10^6$$

Figura 3.4. Expresión del error de masa.

Para asegurar la correcta asignación de masas espectrales, resulta imprescindible un buen ajuste del eje de masas. En el caso de instrumentos con QqQ, la calibración del eje de masas se suele realizar con menor frecuencia debido a que se trabaja con la masa nominal. Sin embargo, analizadores como el TOF deben ser calibrados más asiduamente, para obtener ajustes de masas muy precisos. Estas calibraciones se pueden realizar con mezclas de compuestos de masa conocida a lo largo de todo el rango de masas que se desea calibrar, resultando frecuente el empleo de compuestos que forman aductos consigo mismos. Además, en el TOF, para lograr una alta exactitud de masa, es aconsejable el uso de una sustancia de referencia o *lock mass* que se adiciona post-columna y se adquiere periódicamente a lo largo del cromatograma (Grimalt, 2009). La masa conocida del *lock mass* se usa para recalcular el valor de todas las masas obtenidas durante la adquisición.

Para el correcto desarrollo y validación del método analítico empleado en el control de plaguicidas en alimentos, resulta imprescindible considerar la Guía SANTE,

documento nº SANTE/11312/2021 (Comisión Europea, 2020). Este documento se enfoca principalmente en el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos. Además, establece el número de iones necesarios para identificar un compuesto en función del tipo de analizador de espectrometría de masas empleado. Para analizadores de LRMS, se establecen mínimo 2 o 3 iones como criterio de identificación, mientras que en el caso de HRMS, se han de detectar 2 iones (uno de ellos debe de ser el ion precursor) con exactitud de masa inferior a 5 ppm, lo cual queda reflejado en la tabla 3.3. También, el ion monitorizado debe de estar presente en, al menos, 5 scans consecutivos.

Tabla 3.3. Iones para la identificación con MS, adaptación de la guía SANTE (Comisión Europea, 2020).

Resolución MS	Analizador	Modo de adquisición	Nº mínimo de iones
LRMS	Cuadruplo, trampa de iones, TOF	Barrido completo (<i>full scan</i>), rango de <i>m/z</i> limitado, SIM	3 iones
	Triple cuadrupolo, Q-Trap, Q-TOF	<i>Full scan</i> , SRM/MRM	2 iones producto
HRMS	(Q)-Orbitrap, (Q)-TOF	<i>Full scan</i> , rango de <i>m/z</i> limitado, SIM, fragmentación con y sin selección de ion precursor	2 iones (ion molecular), exactitud de masa < 5 ppm

Resulta de interés destacar que la identificación mediante monitorización de iones seleccionados o *selected ions monitoring* (SIM) depende en gran medida de la selección de dichos iones. Los iones precursores, las moléculas protonadas o desprotonadas, así como los diversos aductos que se puedan formar, son de gran utilidad. En general, los iones de mayor *m/z* presentan una selectividad mayor que iones con menor *m/z*. Para seleccionar los iones, también hay que considerar las posibles interferencias.

Además, los analizadores de QqQ suelen operar mediante monitorización selectiva de transición de iones (MRM). Así, tienen lugar dos etapas secuenciales de análisis de masas independientes (Busch, 2002). Permite seleccionar un ion precursor y un ion

producto para cada compuesto. Se logra gran sensibilidad y selectividad en el análisis rutinario (Schreiber *et al.*, 2011). En cambio, los analizadores Q-TOF suelen llevar a cabo barrido de iones producto, donde se seleccionan fragmentos para confirmar los analitos. En la figura 3.5 se recogen ambas aproximaciones (Lin *et al.*, 2014).

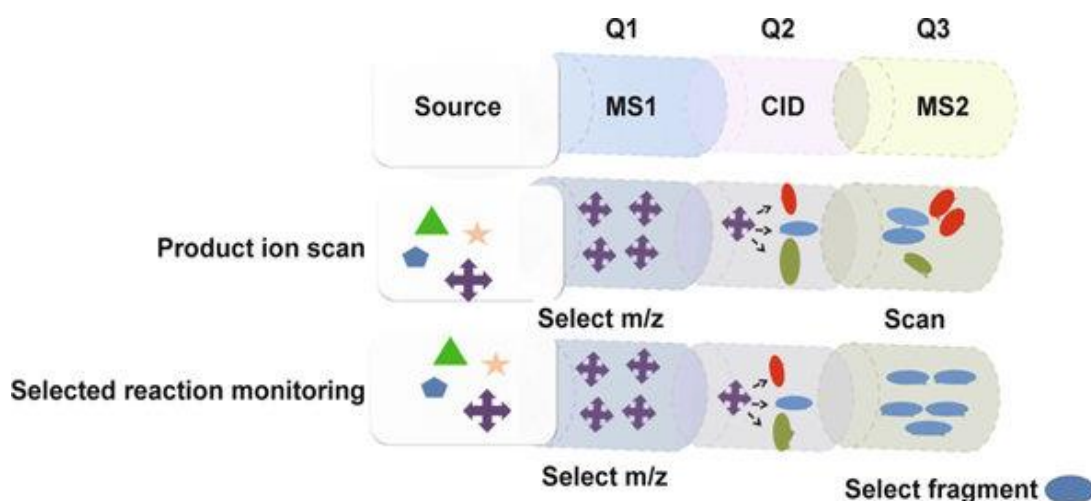


Figura 3.5. Modos de scan en espectrometría de masas en tándem: barrido de iones producto (arriba) y MRM (abajo) (Lin *et al.*, 2014).

Posteriormente, al llevar a cabo la extracción de los cromatogramas de los analitos, los picos correspondientes a los distintos iones seleccionados para un mismo analito han de solapar y deben corresponderse con el tiempo de retención y la forma del correspondiente patrón de calibración. En cualquier caso, la principal utilidad de dichos cromatogramas será la detección de interferencias y no la identificación de analitos. Si el análisis inicial no proporciona resultados concluyentes, se requiere un análisis de confirmación, que suele implicar un nuevo análisis del extracto de la muestra. Se analizará otra porción de la muestra en caso de que se exceda un LMR. También se recomienda un análisis de confirmación si se identifican plaguicidas en matrices poco frecuentes (Comisión Europea, 2020).

En consecuencia, para trabajar en HPLC-HRMS, se han desarrollado tres aproximaciones, según el objetivo del análisis: *target analysis*, *suspect screening* y *non-target screening*, cuyas metodologías y características se esquematizan en las figuras 3.6 (López-Ruiz, 2020) y 3.7 (Llorca y Rodríguez-Mozaz, 2013).

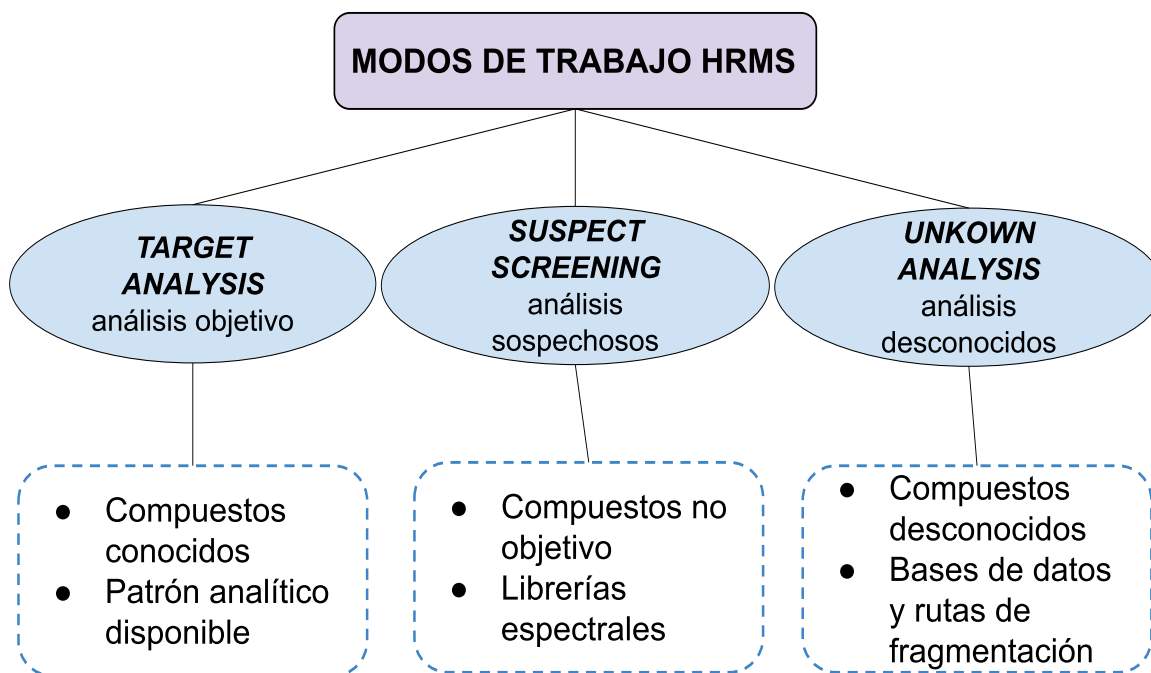


Figura 3.6. Características modos de trabajo HRMS, (López-Ruiz, 2020).

Cuando los analitos son perfectamente conocidos y se dispone de patrones para ellos, se usa el *target analysis*. En este método, el Q-TOF proporciona mayor selectividad gracias a la medición precisa de la masa exacta del ion, a pesar de que los límites de detección son inferiores para QqQ. Esta última permite la identificación de plaguicidas en concentraciones de ppt (partes por trillón) en matrices alimentarias con cuatro e incluso cinco puntos de identificación, mientras que Q-TOF se usa con frecuencia en la caracterización de analitos. Al trabajar con Q-TOF, a veces la sensibilidad resulta insuficiente (Holcapek *et al.*, 2012).

En caso contrario, se emplean *suspect screening* o *non-target screening*, ambos basados en la identificación tentativa del analito según su masa exacta y los fragmentos derivados del ion precursor; aunque la identificación completa requiere el uso del correspondiente patrón analítico o de una técnica ortogonal (López-Ruiz, 2020). Por ello, se suele expresar la identificación tentativa de cada compuesto según una serie de niveles de confianza, del 1 al 5, siendo 5 el nivel de menor fiabilidad y el nivel 1 supone la confirmación definitiva de la estructura usando un patrón analítico (Schymanski *et al.*, 2015).

El *suspect screening* se basa en el empleo de librerías o bases de datos, que recogen una inmensa variedad de compuestos. El acceso a ellas puede ser mediante su adquisición en la casa comercial correspondiente, o pueden ser elaboradas por los propios investigadores. Para que una base de datos sea útil resulta importante que las condiciones del análisis realizado sean las mismas que las recogidas en dicha librería. Las bases de datos incluyen la masa exacta del ion precursor y los fragmentos o iones producto, y detallan aspectos como el sistema cromatográfico usado, el modo de ionización, los aductos formados o la energía de colisión durante la fragmentación del precursor. Se generan archivos de datos tipo “.csv”, que se implementan en software de análisis como TraceFinder®, MassFragment (Waters™) o Metaboscape®.

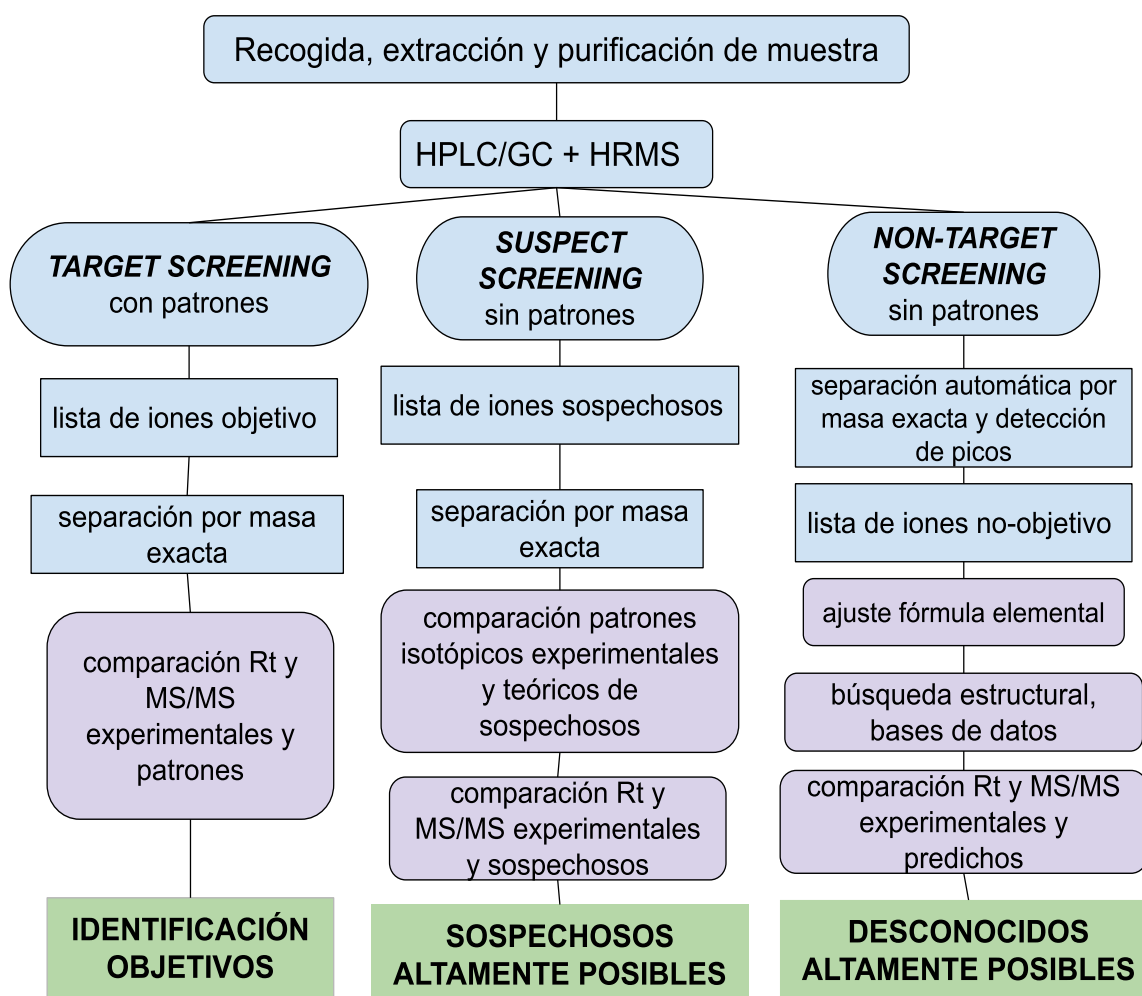


Figura 3.7. *Workflow* de los modos de trabajo en HRMS (adaptación de Llorca y Rodríguez-Mozaz, 2013).

La identificación se lleva a cabo mediante comparación: el error relativo de masa máximo para el ion precursor es 5ppm y para los fragmentos, 10ppm. Dicho método se suele emplear cuando hay acceso a información contrastada sobre análisis previos y resulta de especial interés para maximizar el número de plaguicidas analizados y sus metabolitos (López-Ruiz, 2020). En cuanto a los analizadores, el Q-TOF no requiere preselección de los analitos, a diferencia del QqQ, aunque su sensibilidad es menor, impidiendo analizar plaguicidas a nivel de ultra-traza.

En el caso de no tener datos previos, se recurre al *non-target screening*. Para ello, se emplean herramientas informáticas que predicen la fragmentación de las especies. Así, posibilita el análisis de especies procedentes de la degradación de los plaguicidas, que pueden ser tóxicos. Como analizador, Orbitrap suele ofrecer los mejores resultados (Lin *et al.*, 2015; Marakov y Scigelova, 2010). Sin embargo, debido a su elevado coste, Q-TOF sigue siendo bastante usado. EL analizador Q-TOF facilita la asignación de la fórmula empírica de los analitos y permite resolver casos de co-elución mediante las masas diferenciales (Lacorte y Fernández-Alba, 2006). Se trata de usar programas específicos, como Compound Discoverer® y MassChemsite®, capaces de generar potenciales estructuras de los metabolitos desconocidos a partir del ion precursor y una librería de reacciones básicas. En este caso, los metabolitos desconocidos, cuyo error asociado ha de ser inferior a 5 ppm, se buscan mediante *m/z* calculada. Por un lado, el uso de bases de datos de acceso gratuito, como MassBank, Chemspider, mzCloud o Human Metabolome Database (HMDB), requiere un tratamiento previo de los datos. En contraste, el manejo de programas analíticos implica un tratamiento de los datos automático, asociando el resultado con determinadas bases de datos proporcionadas por el usuario. Entre estas herramientas, sobresalen Compound Discoverer®, Metaboscape®, MassHunter profiling® (Agilent Technologies) o XCMS (The Scripps Research Institute) (López-Ruiz, 2020). Una vez conocidos los analitos que contaminan la muestra, se puede desarrollar un método concreto enfocado en la detección y cuantificación de los mismos.

3.5. Consideraciones en la cuantificación de plaguicidas en muestras de alimentos mediante LC-MS

En el desarrollo de un método analítico para la determinación de plaguicidas en alimentos es importante considerar el efecto matriz, la linealidad y la sensibilidad si se van a cuantificar los analitos.

3.5.1. Efecto Matriz

El efecto matriz (EM) es el aumento o disminución inesperada de la respuesta de los analitos por la coelución de otros componentes de la matriz. La principal razón es la competición entre los compuestos no volátiles de la matriz y los iones de los analitos para acceder a la superficie de las gotas durante la ionización y pasar a estado gaseoso, quedando justificado que este efecto sea más acusado al usar ESI (King *et al.*, 2000; Kebarle, 2000). Depende tanto del analito como de la matriz (Jansson *et al.*, 2004). El método más sencillo de evaluarlo requiere el empleo de la matriz blanco igual que las muestras. Se extrae la matriz blanco y se lleva a cabo la determinación tras adicionar analito post-extracción (fortificación), para comparar las respuestas con una disolución del patrón de referencia en disolvente. El porcentaje de respuesta del analito en la matriz estudiada frente al patrón en solvente sin matriz puede ser superior al 100% (exaltación) o inferior (supresión). Los efectos de supresión de señal son más habituales (Sancho *et al.*, 2002).

Se intenta evitar el EM mediante patrones internos o mediante calibrado en matriz. En ambos casos, a pesar de que la sensibilidad se puede ver afectada, se consigue compensar el efecto matriz, sin eliminarlo por completo.

Un patrón interno tiene características físico-químicas muy similares a las del analito (retención, ionización, fragmentación), siendo lo más útil el propio analito marcado isotópicamente, lo cual no siempre es posible. La calibración en matriz persigue igualar el efecto matriz en los patrones y en las muestras consiguiendo una calibración adecuada para la cuantificación de la concentración en las muestras. También es posible modificar las condiciones cromatográficas o eliminar interferentes mejorando

las etapas del tratamiento de muestra.

3.5.2. Calibración y rango de linealidad

Al tratarse de un método instrumental, la calibración instrumental y analítica son muy importantes para proporcionar resultados fiables. La calibración analítica consiste en la caracterización de la respuesta instrumental en función del analito y se emplean patrones que contengan al mismo. Se elabora una recta de calibrado a partir de la respuesta de varias disoluciones patrón de concentración conocida. Se representa la respuesta del instrumento en el eje y de la gráfica, y el eje x recoge las concentraciones de los patrones. Una vez elaborada la gráfica, es posible obtener mediante interpolación (o extrapolación) la concentración de la muestra, tras obtener la señal instrumental en las mismas condiciones que los patrones (Miller y Miller, 2002). La curva de calibración ha de ser lo más recta posible y, con dicho fin, se emplea método de los mínimos cuadrados (Coello y Maspoch, 2007). A partir de ella, se pueden determinar otros parámetros como el límite de detección y de cuantificación, así como el intervalo de linealidad.

Los principales tipos de calibración son calibración externa, calibración por adición de patrón y calibración con patrón interno, como recoge la figura 3.8. Cabe destacar el uso de varios patrones internos para la calibración en métodos multi-residuo. En cambio, se desaconseja el uso de la calibración por adición de patrón en LC-MS porque el efecto matriz depende de la co-elución de cada plaguicida con otros componentes de la matriz, y suele haber grandes diferencias entre matrices (Comisión Europea, 2021).

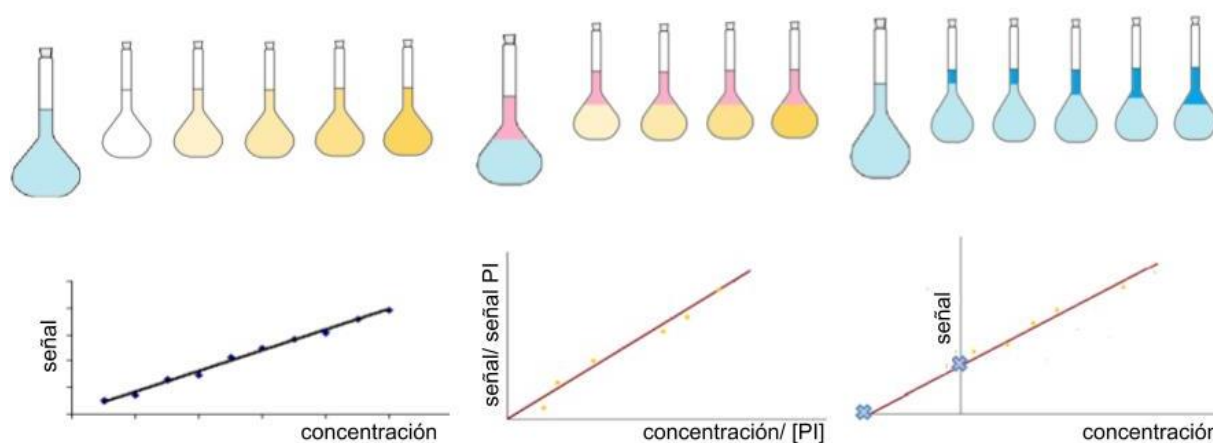


Figura 3.8. Calibración externa, con patrón interno y por adición de patrón (de izquierda a derecha).

El rango lineal es el intervalo desde el límite de cuantificación, hasta la máxima concentración en que la respuesta del método se comporta linealmente, y se considera adecuado para la determinación de la concentración cuando incluye al menos un valor 20% menor del mínimo valor ensayado y hasta un valor del 20% mayor del máximo valor esperado. Un coeficiente de correlación superior a 0.99 indica un ajuste adecuado. La ordenada en el origen no ha de ser significativamente superior a cero y los residuales en el ajuste lineal no deben superar el 30% (Grimalt, 2009). Los instrumentos de LC-MS muestran una deriva de la señal con el tiempo, lo cual puede influir negativamente en la cuantificación. La mejora de este parámetro se lleva a cabo optimizando la instrumentación.

3.6. Caso de estudio: Determinación de residuos de plaguicidas en mango

3.6.1. El mango

El mango (*Mangifera indica* L.) es una fruta tropical originaria de India y el Sudeste de Asia, incluida dentro de las drupas o frutas con hueso. Se trata de una gran fuente de componentes bioactivos muy interesantes para la salud, reduciendo enfermedades cardiovasculares, problemas tópicos y digestivos (Lebaka *et al.*, 2021; Maldonado-Celis *et al.*, 2019). Como consecuencia de su composición, valor nutricional y versatilidad en la cocina, el consumo nacional de mango ha aumentado notoriamente en los últimos años, llegando a triplicarse entre 2014 y 2019 (ASAJA Málaga, 2019). Cabe destacar que, entre las frutas tropicales, el mango (junto con el mangostino y la guayaba) ha experimentado un mayor aumento del consumo en los últimos años en comparación con el resto de frutas tropicales más comunes, como refleja la figura 3.9 (FAO y OECD, 2020).

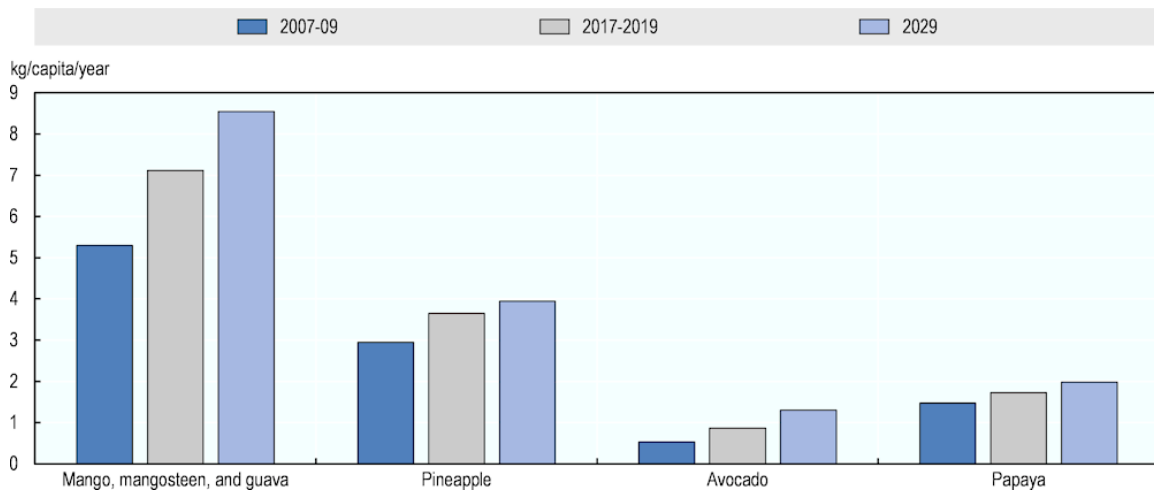


Figura 3.9. Gráfico de consumo mundial de frutas tropicales más comunes (FAO y OECD, 2020).

En la UE, España es el tercer importador, el segundo comercializador y el primer productor de mango. En nuestro país, Canarias es responsable del 23% de la producción de mango, mientras que el 77% corresponde a Andalucía, en concreto a Granada (13%) y Málaga (86%), debido al clima de dichas zonas, más próximo a las regiones tropicales (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2007; Observatorio de Precios y Mercados de la Junta de Andalucía, 2021).

Hay distintas variedades de mango según su tamaño, forma, color y sabor, siendo el mango Osteen la más cultivada en España. Se caracteriza por su piel rojo púrpura (apreciable en la figura 3.10), interior es amarillo anaranjado y sabor muy dulce. También se produce mango Kent, Keitt e Irwin, aunque la variedad más común en los supermercados es Tommy Atkins, de mayor tamaño y más resistente a daños mecánicos, pero menor intensidad de sabor (Gastroactitud, 2020).



Figura 3.10. Mango Osteen (Frutas TROPS, 2016).

En el mango, al igual que en otras frutas de hueso, se distinguen tres partes: la pulpa (mesocarpio), la piel (epicarpio) y el hueso (endocarpio). La pulpa y la piel son el 85% del mango, mientras que el hueso constituye el 15% restante. La composición del

mango depende de la madurez del mismo, de la variedad de la que se trate o de la zona en la que se ha cultivado, entre otros factores (Lebaka *et al.*, 2021). Su composición se resume en la tabla 3.4 (Maldonado-Celis *et al.*, 2019).

Principalmente, se consume la pulpa del mango, cuyo contenido en agua es del 75-85%. En cuanto al contenido en carbohidratos, el mango maduro es rico en azúcares (fructosa, glucosa, sacarosa), mientras que el mango inmaduro es fuente de almidón y pectina. El contenido proteico es bajo. Los aminoácidos más abundantes son el ácido glutámico, la arginina y la lisina, mientras que, en el contenido destacan el ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico. Entre los ácidos orgánicos, que aportan sabor, sobresalen el ácido cítrico y málico. Por otro lado, el mango es rico en micronutrientes, entre los cuales el potasio, el ácido ascórbico y el calcio son los más abundantes. Además, gran variedad de compuestos fenólicos y pigmentos son los responsables de los numerosos beneficios asociados al consumo del mango (Maldonado-Celis *et al.*, 2019).

Tabla 3.4. Información nutricional del mango (Maldonado-Celis *et al.*, 2019) .

Componente	Contenido (en 100g de fruta)
Energía (kcal)	62.1-190.0
Agua (g)	78.9-82.8
Carbohidratos (g)	16.2-17.18
Lípidos (g)	0.30-0.53
Proteínas (g)	0.36-0.40
Fibra (g)	0.85-1.06

En cuanto al contenido de residuos de plaguicidas en mangos, este es especialmente bajo, como refleja su posición en la lista *Clean fifteen 2022*, donde se recopilan los quince vegetales con menores contenidos de residuos de plaguicidas y que se refleja en la figura 3.11 (EWG, 2022). Según el Codex, el mango se incluye en el grupo 14, “frutas variadas de piel no comestible”, por lo cual, para el análisis de residuos de

plaguicidas en mango, se emplea toda la fruta a excepción del hueso, pero el porcentaje se calcula sobre el peso total (CCPR, 2010).



Figura 3.11. Lista “Clean fifteen 2022” (EWG, 2022).

Habiendo recalcado la creciente importancia del mango en el sector alimentario, queda justificada la necesidad de un análisis de dicho producto, con el fin de asegurar que se cumple con la legislación vigente y que su consumo no supone un compromiso para la salud. Para abordar dicho análisis usando espectrometría de masas de alta resolución, el primer paso ha sido realizar una búsqueda bibliográfica sobre los métodos analíticos utilizados para el análisis de residuos de plaguicidas en mango y otras frutas tropicales. Los resultados de esta búsqueda se presentan y discuten en el siguiente apartado.

3.6.2. Antecedentes en la determinación de residuos de plaguicidas en mango

En la tabla 3.5 se recogen los artículos más recientes sobre la determinación de residuos de plaguicidas en mango, empleando técnicas cromatográficas con detección por espectrometría de masas. Se han destacado los métodos de tratamiento de muestra y de análisis usados en estudios previos, siendo tan empleado el acoplamiento GC-MS (para los residuos más apolares y volátiles) como el de LC-MS. La extracción sólido-líquido (SLE) ha sido utilizada como paso previo al análisis LC-MS de varios tipos de frutas tropicales, como maracuyá, papaya o manzana de Java (Botero-Coy *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2016). Sin embargo, para el análisis de residuos de plaguicidas en mango, la SLE es poco usada. Una de las principales desventajas

del uso de SLE es el alto consumo de disolventes. Por otro lado, la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) también ha sido usada en mango y papaya como paso previo al análisis por GC-MS (Navickiene *et al.*, 2010). En la MSPD se emplean menores volúmenes de disolventes, pero esta técnica presenta como principal desventaja la dificultad de automatización del paso de dispersión de la muestra con la fase sólida en un mortero, que suele hacerse de forma manual.

Se aprecia el predominio del método QuEChERS (Bilehal *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2022), y el uso frecuente de carbón negro grafitizado (GCB), por su capacidad para eliminar pigmentos potencialmente interferentes (Savant *et al.*, 2010; Pastor *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018; Bilehal *et al.*, 2017). Además, la versión del método QuEChERS-AOAC, que emplea un tampón de ácido acético/acetato de sodio para la extracción con acetonitrilo, también proporciona buenos resultados en matrices de mango (Srivastava *et al.*, 2014; Deepa *et al.*, 2010; Filho *et al.*, 2012; Balkan y Karaağaçlı, 2023; Sivaperumal *et al.*, 2017). Algunos autores han empleado formiato de amonico en el método QuEChERS para la extracción de plaguicidas en chirimoya y maracuyá, observando también buenos resultados (Varela-Martínez *et al.*, 2020).

También es apreciable en la tabla 3.5 que, a excepción de la cuantificación de imidacloprid en mangos de India (Patel *et al.*, 2022), predominan los métodos de análisis multirresiduo, que permiten la identificación de hasta 301 plaguicidas (Balkan y Karaağaçlı, 2023).

Tabla 3.5. Revisión bibliográfica análisis de residuos de plaguicidas en mango

Método de extracción	Técnica de análisis	Nº plaguicidas incluidos en el estudio	Referencia
MSPD	GC-MS	7	(Navickiene <i>et al.</i> , 2010)
QuEChERS	HPLC-MS	5	(Bilehal <i>et al.</i> , 2014)
	HPLC-MS/MS	1	(Patel <i>et al.</i> , 2022)
QuEChERS (PSA, GCB)	GC-MS/MS	50	(Savant <i>et al.</i> , 2010)
		28	(Pastor <i>et al.</i> , 2015)
		47	(Bilehal <i>et al.</i> , 2017)
	GC-MS/MS y UHPLC-MS/MS	113	(Li <i>et al.</i> , 2018)
QuEChERS-AOAC	GC-MS	17	(Srivastava <i>et al.</i> , 2014)
	GC-MS/MS	20	(Deepa <i>et al.</i> , 2010)
	LC-MS/MS	98	(Filho <i>et al.</i> , 2012)
	LC-MS/MS y GC-MS	301	(Balkan y Karaağaçlı, 2023)
	UHPLC-Q-TOF/MS	68	(Sivaperumal <i>et al.</i> , 2017)

A partir de dicha revisión, se ha decidido emplear el método QuEChERS-AOAC para la extracción de los plaguicidas de las muestras de mango. En cuanto a la técnica de análisis se ha elegido trabajar mediante cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas, con analizador de cuadrupolo-tiempo de vuelo (UHPLC-Q-TOFMS). Así, se puede llevar a cabo un análisis no dirigido de datos de masas exactas para la identificación de residuos de plaguicidas. Una vez identificados los residuos presentes en las muestras con este análisis no dirigido, se podría realizar un análisis dirigido para los compuestos encontrados. La elección de

LC-MS frente a GC-MS para el análisis no dirigido está motivada, entre otras razones, por la mayor disponibilidad de cromatógrafos de líquidos acoplados a espectrómetros de masas de alta resolución. El acoplamiento GC-HRMS es menos frecuente y, aunque se espera su instalación en un futuro en los servicios centrales de apoyo a la investigación, por ahora, la Universidad de Jaén no cuenta con él.

4. EXPERIMENTAL

4.1. Materiales y reactivos

Los patrones de los plaguicidas fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Se prepararon disoluciones concentradas de $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada compuesto usando metanol o acetonitrilo como disolvente, y se almacenaron en el congelador a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$. A partir de ellas, se preparó una disolución multipatrón de $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en metanol, conteniendo los 11 plaguicidas elegidos. A partir del multipatrón, se preparó una curva de calibrado para la cuantificación de los analitos, siendo las concentraciones analizadas de $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $500 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. En este caso, el disolvente empleado fue $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (80:20 v/v). Todas las disoluciones fueron conservadas a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

Los disolventes metanol y acetonitrilo de calidad HPLC, y agua de calidad LC-MS se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania), así como el ácido acético. Los reactivos sólidos acetato de sodio (NaCOOCH_3), el sulfato de magnesio anhidro (MgSO_4) y la amina primaria-secundaria (PSA) se compraron de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Los extractos fueron filtrados con filtros de nylon de $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ de poro, obtenidos de LLG Labware (Tarragona, España). Además, en el procedimiento experimental fueron necesarios una centrífuga 2-16P de Sartorius (Göttingen, Germany), y un evaporador TurboVap LV (Caliper Life Sciences, Waltham, MA, EE.UU.)

4.2. Tratamiento de muestra

Para llevar a cabo la etapa de tratamiento de muestra, se comienza con una extracción usando el método QuEChERS-AOAC (Filho *et al.*, 2012), en el que se emplea un tampón ácido acético/acetato sódico en la etapa de extracción sólido-líquido con acetonitrilo. Seguidamente, se realiza una purificación mediante dSPE, usando PSA como sorbente. Este método ha sido previamente utilizado para el análisis de residuos de 98 plaguicidas en mango (Filho *et al.*, 2012).

Inicialmente, se pesan 10 g de muestra, previamente triturada y homogeneizada, en un tubo de centrífuga de 50 mL. A continuación, se añaden 10 mL de acetonitrilo:ácido acético (99:1 v/v) y se agita manualmente el tubo durante 1 minuto. Después, se añade

1 g de CH_3COOH y 4 g de Na_2SO_4 . El siguiente paso consiste en centrifugar los tubos a 4000 rpm durante 5 minutos, habiéndolos agitado previamente en el Vortex. Una vez separadas las fases, se toman 3 mL de sobrenadante y se transfieren a un tubo de centrifuga de 15 mL, al cual se adicionan 450 mg de Na_2SO_4 y 150 mg de PSA. Nuevamente, se centrifuga durante 5 minutos a 4000 rpm. Para continuar, se toman 2 mL del sobrenadante y se lleva a un tubo de ensayo, que se introduce en el evaporador. Se evapora el disolvente a una temperatura de 30-40°C durante 40 minutos. Seguidamente, se reconstituye hasta 2 mL usando $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (20:80 v/v) como disolvente. Como paso previo a la inyección en el cromatógrafo, el extracto se filtra con un filtro de nylon 0.22 μm de poro y se transfiere al vial de cromatografía. Todo el procedimiento queda recogido en la figura 4.1. En caso de que el extracto no se analice *ipso facto*, se conserva congelado a -18°C.

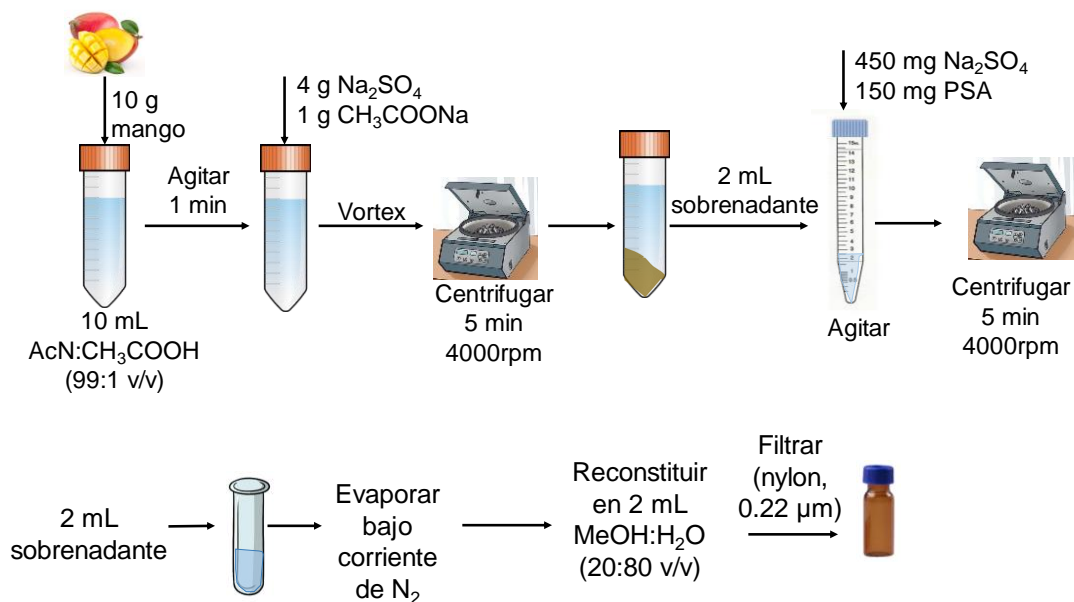


Figura 4.1. Tratamiento de muestra mediante QuEChERS-AOAC (Adaptado de Filho *et al.*, 2012).

4.3. Instrumentación

El equipo usado para la separación e identificación, tanto de los analitos como de la disolución multipatrón fue un cromatógrafo de líquidos UHPLC (Agilent 1260, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.), equipado con un desgasificador a vacío, un muestreador automático y una bomba binaria. Se ha empleado una columna de fase reversa C_{18} Kinetex de 50 mm \times 2.1 mm de diámetro interno, 1.8 μm de tamaño de partícula (Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.). La fase móvil empleada consistió en

una mezcla de agua (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B), ambas con un 0.1% de ácido fórmico. El gradiente usado para lograr la elución de los analitos mantuvo constante la composición inicial de la fase móvil (5% B) durante 2 minutos, para continuar con un gradiente lineal hasta alcanzar 100% B en 8 minutos, composición que se mantuvo durante otros 2 minutos. Durante todo el gradiente, la velocidad de flujo fue $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. En consecuencia, se trata de un análisis de 12 minutos, aunque se requieren 5 minutos tras cada muestra para acondicionar nuevamente la columna para el siguiente análisis. En cada análisis se inyectó un volumen de $20 \mu\text{L}$ de extracto.

El sistema de UHPLC se acopló a un espectrómetro de masas con un analizador de tiempo de vuelo, Agilent Q-TOF 6530 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU, equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI), operando en modo de ionización positiva. El espectrómetro operó con los parámetros que se detallan en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Parámetros empleados en el espectrómetro de masas.

Parámetro	Valor
Voltaje del capilar	4000 V
Voltaje de fragmentación	90 V
Temperatura del gas de secado	325 °C
Flujo del gas de secado	$9 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$
Presión del gas del nebulizador	40 psig
Rango de masas	50-1000 m/z

Se llevaron a cabo dos experimentos distintos simultáneamente: adquisición en *full scan* y *all-ion mode MS/MS*. La energía de colisión usada fue de 0V (*full scan*) y 20V (*all-ion mode*) usando 400 ms para cada experimento (1.25 espectro/puntos de adquisición por segundo). La medida de las masas exactas de cada pico se ha obtenido mediante un sistema de calibrado automático que emplea un nebulizador con fuente dual, que combina el flujo del cromatógrafo con el pequeño flujo de una disolución de calibrado (disolución de calibrado A, Agilent Technologies), que contiene purina ($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4$, m/z :121.050873) y HP-0921 ($\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{N}_3\text{P}_3\text{F}_{24}$, m/z : 922.009798). Todos los datos fueron recogidos con el software Agilent MassHunter Data Acquisition (versión B.04.00). El procesamiento de los mismos se llevó a cabo con el software Agilent MassHunter Qualitative Analysis (versión B.04.00).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. *Suspect screening* de plaguicidas en mango

Tal y como se ha descrito en el apartado 3, se preparó un extracto de cada una de las muestras de mango siguiendo el método QuEChERS-AOAC y se analizó mediante UHPLC-Q-TOFMS. Una vez obtenidos los cromatogramas, se procedió al procesamiento de los datos mediante un análisis no dirigido de compuestos sospechosos o *suspect screening*, siguiendo el procedimiento esquematizado en la figura 5.1.

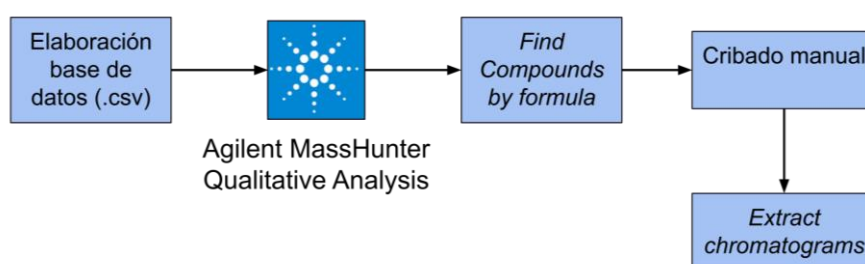


Figura 5.1. Esquema del procesamiento de datos usando Agilent MassHunter Qualitative Analysis.

El primer paso fue elaborar una base de datos en formato .csv, compatible con el software de tratamiento de datos (Agilent MassHunter Qualitative Analysis, versión B.04.00), en la que se incluyeron el nombre, la fórmula y la masa molecular de 416 plaguicidas (Pérez-Ortega *et al.*, 2016), cuyos tiempos de retención eran desconocidos en las condiciones cromatográficas empleadas. A continuación, se comparó el cromatograma de cada una de las muestras con la base de datos, utilizando la herramienta “*Find Compounds by formula*”. Se acotaron los parámetros de comparación, teniendo en cuenta que se ha trabajado con ionización en modo positivo, y estableciendo un error máximo de 5 ppm en la masa exacta. Como resultado, el software proporcionó un número elevado de posibles positivos de plaguicidas (entre 23 y 48) en cada una de las muestras.

Para continuar, se hizo un cribado de esos plaguicidas manualmente, considerando la intensidad, el patrón isotópico, las masas de los posibles fragmentos, y que los picos cromatográficos estén bien definidos y que no formen parte del ruido instrumental (es decir, que estén por encima del límite de detección). De dicho modo, se redujo notablemente el número de posibles positivos de plaguicidas de

cada muestra (entre 5 y 11).

El siguiente paso consiste en extraer los cromatogramas correspondientes a la masa exacta (EIC – *extracted ion chromatogram*) de cada uno de los plaguicidas en cada muestra, para lo cual se empleó la herramienta “*Extract chromatograms*”. Se introdujeron los valores de m/z tanto de las masas exactas de los iones precursores como de los fragmentos más comunes en cada caso (Pérez-Ortega, 2015). De esta manera, en el segundo nivel de cribado manual solo se consideraron positivos aquellos picos cromatográficos por encima del límite de detección para los que se observase su fragmentación característica, coincidiendo el tiempo de retención del ion precursor y de sus fragmentos. En consecuencia, el número de plaguicidas en cada muestra disminuyó significativamente (entre 1 y 6). La figura 5.2 muestra esta etapa del proceso, aplicada a una de las muestras. En ella se observa la identificación de azoxystrobin, para el que se obtienen la molécula protonada ($[M+H]^+$), el aducto de sodio ($[M+Na]^+$) y un fragmento característico ($C_{21}H_{15}N_3O_4$, m/z 372.0977), todos con un error de masa < 5 ppm y a un tiempo de retención coincidente.

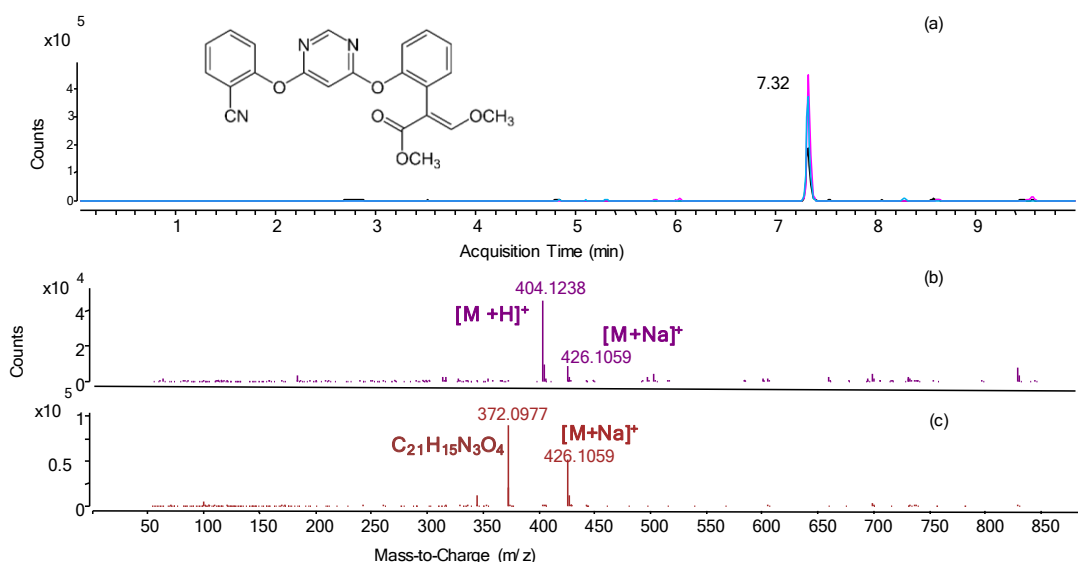


Figura 5.2. Extracción de cromatogramas para la identificación de azoxystrobin en la muestra 11. (a) Superposición de picos cromatográficos; (b) Espectro de masas con los iones precursores (*full scan*); (c) Espectro de masas con los fragmentos (*all-ion*).

En total, se encontraron 11 posibles residuos de plaguicidas diferentes en las muestras. Para confirmar o descartar que los picos sospechosos se corresponden

con residuos de plaguicidas, se preparó una disolución multipatrón con estándares analíticos comerciales de esos 11 plaguicidas. Se analizó dicha disolución multipatrón para conocer inequívocamente los tiempos de retención de los plaguicidas en las condiciones cromatográficas del análisis, los cuales quedan recogidos en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Tiempos de retención de los plaguicidas patrón.

Plaguicida	Tiempo de retención (min)
azoxystrobin	7.31
carbendazim	1.35
cycloheximid	5.66
deet	6.41
fenpropimorph	6.49
isoprocarb	6.56
metolcarb	1.34
oxfendazole	5.56
pirimicarb	4.52
pyraclostrobin	8.07
tebuconazole	7.39

Los cromatogramas extraídos de los patrones se utilizan para confirmar la presencia de los plaguicidas en las muestras mediante una doble comparación. Por un lado, se compararon uno a uno los picos cromatográficos de los plaguicidas con los patrones correspondientes, lo cual se ejemplifica en la figura 5.3. Como se puede observar, el tiempo de retención del plaguicida azoxystrobin, coincide con el tiempo de retención del pico cromatográfico detectado en la muestra. En consecuencia, ambos picos se superponen en un tiempo de elución de 7.32 minutos.

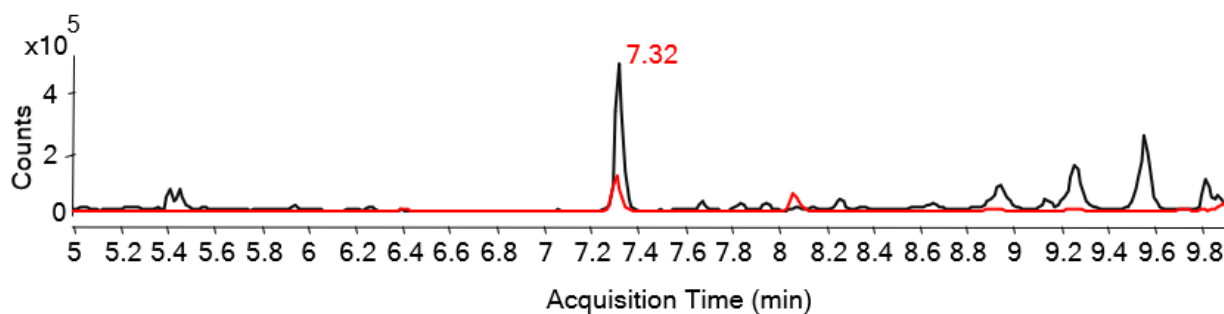


Figura 5.3. Comparación del pico cromatográfico de azoxystrobin en la muestra 11 (negro) y en un patrón de 50 mg·L⁻¹ (rojo).

Por otro lado, se compara la coincidencia de los espectros de masas de los sospechosos con los de los patrones. En la Figura 5.4 se muestra como ejemplo la comparación del espectro de masas del tebuconazole. Como se puede observar, en ambos casos se detecta la molécula protonada [M+H]⁺ y el patrón isotópico del patrón y de la molécula sospechosa coinciden.

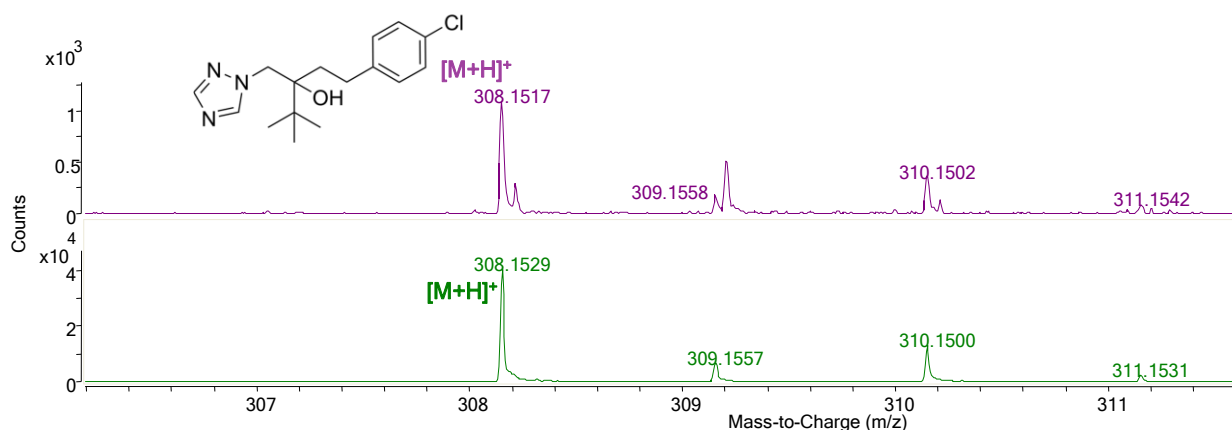


Figura 5.4. Comparación del espectro de masas *full-scan* de tebuconazole en la muestra 8 (arriba) y el patrón de 50 mg·L⁻¹ (abajo).

Tras esta comparación de los patrones con las muestras, se confirmó la presencia de 6 residuos de plaguicidas distintos en las muestras analizadas, concretamente azoxystrobin, carbendazim, fenpropimorph, isoprocarb, pyraclostrobin, y tebuconazole. La presencia de cada uno de estos residuos en las diferentes muestras se discute en detalle en el siguiente apartado.

5.1.1. Resultados del análisis de las muestras de mango

Se han analizado un total de 12 muestras de mango, adquiridos cada uno de ellos en un establecimiento distinto de la ciudad de Jaén. Las muestras codificadas como M3, M8 y M11 se adquirieron en fruterías locales, mientras que el resto se compraron en supermercados. Ninguna de las muestras era de origen ecológico, por lo que cabría esperar que se hayan utilizado productos fitosanitarios para el control de plagas, dentro de los límites establecidos.

Entre ellos, el mango con más plaguicidas identificados en la primera etapa del procesamiento de datos fue M12 (48 plaguicidas) y el menos contaminado resultó ser M1 (23 plaguicidas). Tras el primer cribado, M12 continuó siendo la que más plaguicidas contenía (11 plaguicidas), mientras que M5 y M9 destacaron por su bajo contenido (5 plaguicidas en ambos casos). En el siguiente paso, tras extraer los cromatogramas y los espectros, M2 destacó como la menos contaminada, pudiendo identificar en ella Azoxystrobin únicamente, mientras que había muestras en las que se identificaban hasta 6 plaguicidas. Finalmente, al comparar con los patrones, no se identificó ningún plaguicida en M4, mientras que M11 resultó ser la muestra más contaminada con hasta 4 plaguicidas (azoxystrobin, carbendazim, pyraclostrobin y tebuconazole). Dichos resultados se pueden observar en la tabla 5.2, donde se recoge la variación en el número de plaguicidas identificados tras cada etapa del procesamiento de datos para las distintas muestras.

Tabla 5.2. Número de plaguicidas identificados tras cada etapa del tratamiento de datos.

Muestra	Etapas del tratamiento de datos				Plaguicidas
	<i>Find by Formula</i>	Cribado manual	Extracción cromatogramas	Comparación con patrones	
M1	23	7	4	2	azoxystrobin, carbendazim
M2	42	5	1	1	azoxystrobin
M3	45	6	3	1	azoxystrobin
M4	39	8	6	0	-
M5	46	5	4	1	azoxystrobin
M6	40	8	6	3	azoxystrobin, carbendazim, isoprocarb
M7	33	7	6	2	azoxystrobin, isoprocarb
M8	35	6	6	3	azoxystrobin, pyraclostrobin, tebuconazole
M9	30	5	4	2	azoxystrobin, isoprocarb
M10	38	6	5	2	azoxystrobin, fenpropimorph
M11	34	6	3	4	azoxystrobin, carbendazim, pyraclostrobin, tebuconazole
M12	48	11	6	3	azoxystrobin, pyraclostrobin, tebuconazole

Como se aprecia en la figura 5.5, entre los plaguicidas identificados, el más frecuente es el azoxystrobin, presente en más del 90% de las muestras. El isoprocarb es el segundo plaguicida con un mayor porcentaje de detección (25%). También se identifican pyraclostrobin y tebuconazole, ambos contenidos en las dos mismas muestras (M8 y M12). Además, el carbendazim está contenido en otras dos

muestras (M1 y M11). Resulta de especial interés destacar la identificación de fenpropimorph en un único mango (M10). Todos los plaguicidas identificados se consideran fungicidas, a excepción del isoprocarb, que actúa como insecticida.

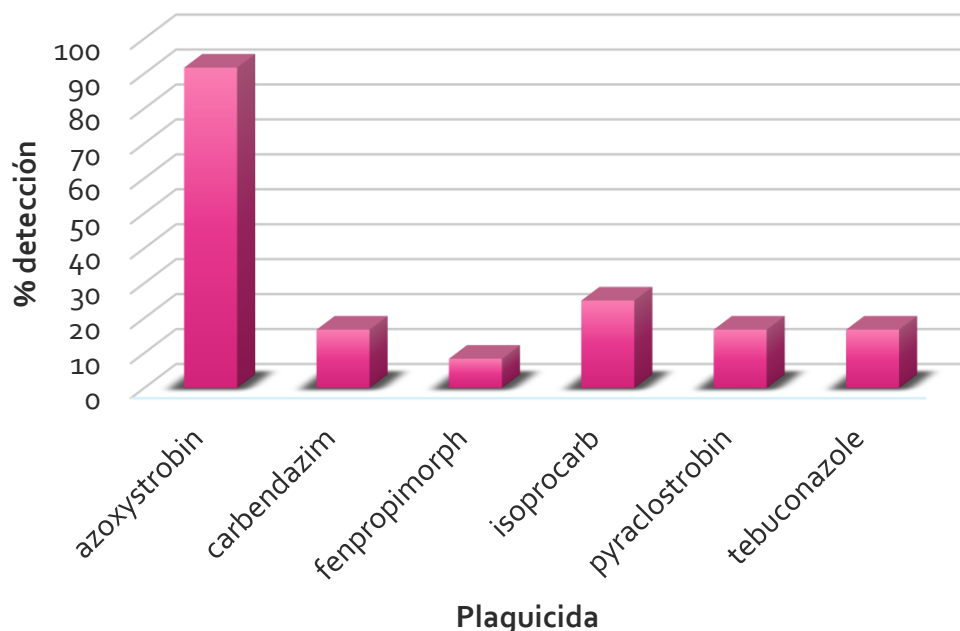


Figura 5.5. Representación gráfica del porcentaje de detección de cada plaguicida.

5.2. Análisis cuantitativo de los residuos de plaguicidas

Con el objetivo de obtener la concentración aproximada de los residuos de plaguicidas encontrados en las muestras de mango, se construyó una recta de calibrado externa en disolvente ($H_2O:MeOH$ 80:20 v/v) a partir de un multipatrón de plaguicidas preparado como se indica en el apartado 3.1. Concretamente, se analizaron las concentraciones: $10 \mu g \cdot L^{-1}$, $50 \mu g \cdot L^{-1}$, $100 \mu g \cdot L^{-1}$ y $500 \mu g \cdot L^{-1}$. El patrón de $500 \mu g \cdot L^{-1}$ estaba saturado y, en consecuencia, no se utilizó para la cuantificación de los plaguicidas. Se construyó una recta de calibrado para cada uno de los 6 plaguicidas confirmados en las muestras de mango mediante la representación del área del pico cromatográfico frente a la concentración. Usando las ecuaciones de las rectas obtenidas, se interpolaron los valores de área de los picos cromatográficos de las muestras y se tuvo en cuenta que no había dilución en las muestras para el cálculo final de la concentración en mg de plaguicida por kg de muestra.

Los plaguicidas que presentaron picos cuyas áreas fueron inferiores al valor correspondiente para los patrones de $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, no pudieron ser cuantificados. Asimismo, los compuestos que presentaron áreas de pico cromatográfico que eran superiores al último punto de la recta de calibrado tampoco pudieron ser cuantificados. En consecuencia, se concluyó que las concentraciones de isoprocarb, tebuconazole y pyraclostrobin eran inferiores a $0.01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ en todos los casos en los que se habían identificado. Además, la concentración de fenpropimorph en la única muestra en la que estaba presente, así como las concentraciones de azoxystrobin y carbendazim en diversas muestras, son superiores a $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. La cuantificación fue posible para el azoxystrobin y el carbendazim en algunas de las muestras. Los resultados de la cuantificación de los extractos se recopilan en la tabla 5.3. En ella, también se compara el contenido en las muestras en las que ha sido posible la cuantificación con los LMRs establecidos (Comisión Europea, 2023). El LMR por defecto para aquellos plaguicidas que no están específicamente regulados es $0.01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Comisión Europea, 2023). Este es el caso del isoprocarb y del metolcarb, entre los plaguicidas cuantificados.

Como se aprecia en la tabla 5.3, los resultados preliminares de la cuantificación del carbendazim, isoprocarb, metolcarb y tebuconazole, cumplen con los LMRs establecidos. El azoxystrobin cumple el LMR en 6 de las muestras analizadas. Sin embargo, para las 6 restantes no es posible afirmarlo. Sería necesario desarrollar un método específico para su cuantificación. Esto se debe a que su concentración es superior a $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, pero no es posible saber si supera o no los $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ establecidos. En cuanto al fenpropimorph cuantificado en la muestra 11, este excede el LMR establecido por defecto, ya que su concentración es superior a $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. En consecuencia, sería de interés desarrollar un método específico para poder contrastar dicho resultado.

Tabla 5.3. Resultados de la cuantificación (mg·kg⁻¹) de azoxystrobin (azoxys.), carbendazim (carben.), fenpropimorph (fenpro.), isoprocarb (isopro.), metolcarb (metol.) y tebuconazole (tebuc.) y LMR para el mango (Comisión Europea, 2023). ND: No detectado

Plaguicidas	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	LMR (mg·kg ⁻¹)
azoxys.	> 0.1	0.09	> 0.1	ND	> 0.1	> 0.1	< 0.01	> 0.1	< 0.01	< 0.01	> 0.1	0.1	4
carben.	0.03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	< 0.01	ND	0.5
fenpro.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	> 0.1	ND	ND	0.01
isopro.	ND	ND	ND	ND	ND	< 0.01	< 0.01	ND	< 0.01	ND	ND	ND	0.01
metol.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	< 0.01	ND	ND	ND	< 0.01	0.01
tebuc.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	< 0.01	ND	ND	ND	< 0.01	0.1

Como puede observarse, los resultados de esta cuantificación son preliminares, y se necesitaría realizar un análisis cuantitativo más exhaustivo con rectas de calibrado preparadas en matriz (por ejemplo, utilizando extracto de la muestra 4, que estaba libre de residuos de plaguicidas), y en un rango de concentraciones más amplio. Además, sería necesario diluir algunos extractos para poder calcular la concentración de azoxystrobin, cuya concentración era superior a $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ en 6 de las muestras, lo cual se aprecia en la figura 5.6. En la misma, también queda reflejado que no fue detectado en el 8% de las muestras, y que el contenido se pudo cuantificar para el 17% de ellas. La concentración de dicho plaguicida fue inferior a $0.01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ para el 25% de las muestras.

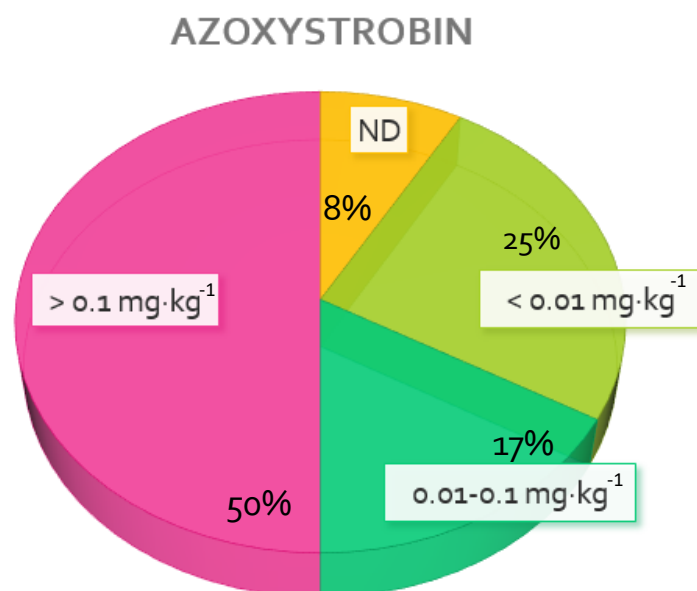


Figura 5.6. Distribución de azoxystrobin en las muestras de mango.

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha desarrollado un método para la identificación de plaguicidas en mango, a través de un *suspect screening*. Para ello, se ha propuesto un análisis basado en el empleo del método QuEChERS-AOC como etapa de tratamiento de muestra. La detección se ha llevado a cabo mediante UHPLC-QTOFMS en modo de ionización positivo. Haciendo uso de una base de datos de elaboración propia

con 416 analitos, se ha logrado confirmar la presencia de 6 plaguicidas, tras aplicar el método a 12 muestras de mango.

El análisis de una disolución multipatrón a distintas concentraciones ha permitido la cuantificación de algunos plaguicidas. No obstante, el siguiente paso sería el desarrollo específico de un método de análisis para los 6 plaguicidas identificados. Cabe destacar la importancia de uno de ellos, el fenpropimorph, ya que parece exceder el LMR en la única muestra en la que se identificó. Por lo tanto, sería interesante comprobar específicamente si esto es así. También, habría que prestar atención al azoxystrobin, ya que es el más empleado.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AKASHE, M.M., PAWADE, U.V., y NIKAM, A.V. (2008): "Classification of pesticides: a review", *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 9 (4), pp.144-150.
- ALDER, L., GREULICH, K., KEMPE, G. y VIETH, B. (2006): "Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS?", *Mass Spectrometry Reviews*, 25, pp. 838-865.
- ANASTASSIADES, M. y LEHOTAY, S.J. (2003): "Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce", *Journal of AOAC International*, 86, pp.412-431.
- APUNTESDE (2022): *¿Qué es y cómo funciona un HPLC? Disponible en línea: <https://apuntesde.es/como-funciona-un-hplc/>*.
- ASOCIACIÓN AGRARIA JÓVENES AGRICULTORES (ASAJA) MÁLAGA (2019): *ASAJA Málaga España ha triplicado su consumo de mango en cinco años. Disponible en línea: <https://www.asaja.com/publicaciones/>*.
- BALKAN, T. y KARAAĞAÇLI, H. (2023): "Determination of 301 pesticide residues in tropical fruits imported to Turkey using LC–MS/MS and GC-MS", *Food Control*, 147, 109576.
- BEDMAR (2011): "¿Qué son los plaguicidas?", *Ciencia Hoy*, 122(2), pp.10-11.
- BILEHAL, D., KHETAGOUDAR, M.C. y CHETTI, M.B. (2017): "A multi-residue analysis of 47 multiclass pesticide residues in mango (*Mangifera indica*) samples by GC-MS/MS using a modified quechers extraction method". *Disponible en línea: <https://www.researchgate.net/>*.
- BILEHAL, D.C., CHETTI, M.B., SUNG, D.D. y GOROJI, P.T. (2014): "Carbendazim, carbaryl and imidacloprid pesticides in mango and pomegranate by QuEChERS method", *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 37,12.
- BOTERO-COY, A.M., MARÍN, J.M., IBÁÑEZ, M., SANCHO, J.V, y HERNÁNDEZ, F. (2012): "Multi-residue determination of pesticides in tropical fruits using liquid chromatography/tandem mass spectrometry", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402, pp. 2287–2300.

- BUSH, K.L. (2002): *A Glossary for Mass Spectrometry*. Disponible en línea: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720000807en.pdf>.
- CHREIBER, A., SASAKI, T., y GAMBLE, T. (2011): *Cuantificación y confirmación del pesticida malatión en muestras de frutas mediante MRM y MS/MS/MS*. Disponible en línea: <https://www.notijenck.com.ar/notas/cuantificacion-y-confirmacion-del-pesticida-malation-en-muestras-de-fruta-mediante-mrm-y-ms-ms-ms>
- CHUNG, S.W.C. y LAM, C.H. (2012): "Development and validation of a method for determination of residues of 15 pyrethroids and two metabolites of dithiocarbamates in foods by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403, pp. 885-896.
- COELLO, J. y MASPOCH, S. (2007): "Regresión lineal por mínimos cuadrados. Calibrado univariable" en BLANCO, M. y CERDA, V. (1ª ed.): *Temas avanzados de quimiometría*, Islas Baleares, Universitat de les Illes Balears.
- COMISIÓN EUROPEA (2010): "Analytical Quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed", SANTE /112682/2019312/2021.
- COMISIÓN EUROPEA (2023). *EU Pesticides database*. Disponible en línea: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/mrls>.
- COMISIÓN EUROPEA (2023). *Active substances, safeners and synergists*. Disponible en línea: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/active-substances>.
- COMITÉ DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS (2010): *Parte del producto a la que se le aplican los límites máximos para residuos y que se analiza*, CA/GL 41-1993. Disponible en línea: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/themes/pesticides/es/>.
- DE HOFFMAN, E. y STROOBANT, V. (2007): *Mass Spectrometry. Principles and Applications (3rd edition)*, Wiley.

- DEEPA, G.T., CHETTI, M.B., KHETAGOUDAR, M.C.C., GOROJI, P.T. y DINESH B.K. (2010): "Validation of GC-MS/MS Method for Multi Residue Analysis of Pesticides in Mango", *International Congress on Analytical Sciences*.
- DUBEY, J.K., PAYTAL, S.K. y SHARMA, A. (2018) : "Validation of QuEChERS analytical technique for organochlorines and synthetic pyrethroids in fruits and vegetables using GC-ECD", *Environ Monit Assess*, 190, 231.
- ENVIRONMENTAL WORKING GROUP (EWG) (2022): *Shopper's Guide to Pesticides in produce*. Disponible en línea: <https://www.ewg.org/foodnews/clean-fifteen.php>.
- FAO y OMS (2015): *Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas*, pp. 6. Disponible en línea: <https://www.fao.org/3/i3604s/i3604s.pdf>.
- FENIK, J., TANKIEWICZ, M. y BIZIUK, M. (2011): "Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables", *Trends in Analytical Chemistry*, 30, pp. 814-826.
- FERRER, C.(2017): *Nuevos desarrollos en el análisis y control de calidad de residuos de plaguicidas en frutas y verduras*, Tesis Doctoral Universidad de Almería.
- FERRER, I., GARCÍA-REYES, J.F. y FERNÁNDEZ- ALBA, A.(2005): "Identification and quantitation of pesticides in vegetables by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry", *Trends in Analytical Chemistry*, 24, pp. 671-682.
- FILHO, A.M., DOS SANTOS, F.N. y DE PAULA PEREIRA, P.A. (2011): "Multi-residue analysis of pesticide residues in mangoes using solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography and UV-Vis detection", *Journal of Separation Science*, 34, 21.
- FILHO, N.F., NASCIMENTO, C.A., FARIA, E.O., CRUVINEL, A.R. y OLIVEIRA, J.M. (2012): "Within-laboratory validation of a multiresidue method for the analysis of 98 pesticides in mango by liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Food Additives and Contaminants*, 29, 4, pp.641-656.

- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (2020): “Bananas and major tropical fruits”, en FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) y ECONOMIC CO-OPERATION DEVELOPMENT (OECD): *OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029*.
- FORO DE ALTO NIVEL DE EXPERTOS (FAO), (2009): *La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050*. Disponible en línea: https://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/Issues_papers_SP/La_agricultura_mundial.pdf.
- FRUTAS TROPS (2016): Osteen, Kent y Keitt, las principales variedades de mango de Frutas TROPS en la campaña de 2016. Disponible en línea: <https://www.trops.es/noticias/osteen-kent-keitt-las-principales-variedades-mango-frutas-trops-la-campana-2016/>.
- GARETH BRENTON, A., y RUTH GODFREY, A. (2010): “ Accurate Mass Measurement: Terminology and Treatment of Data”, *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 21, pp. 1821–1835.
- GASTROACTITUD (2020): *Mangos y aguacates de calidad cultivados en España*. Disponible en línea: <https://www.gastroactitud.com/>.
- GÓMEZ-RAMOS, M.M., FERRER, C., AGÜERA, A. y FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2013): “Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in fruit and vegetables: Screening and quantitative studies”, *Journal of Chromatography A*, 1287, pp. 24–37.
- GRIMALT, S. (2009): *Nuevas aportaciones de LC-MS con analizadores de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo en el análisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en alimentos de origen vegetal*, Tesis Doctoral Universitat Jaume I.
- HOLCAPEK, M., JIRÁSKO, R. y LÍSA, M. (2012): “Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques”, *Journal of Chromatography A*, 1259, pp. 3-15.
- JASSON, C., PIHLSTRÖM, T., ÖSTERDAHL, B y MARKIDES, K.E. (2004): “A new multiresidue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection”, *Journal of Chromatography A*, 1023, 93-104.

- KEBARLE, P. (2000): "A brief overview of the present status of the mechanism involved in electrospray mass spectrometry", *Journal of Mass Spectrometry*, 35, 804-817.
- KING, R., BONFLIGIO, R., FERNÁNDEZ-METZLER, C., MILLER-STEIN, C. y OLAH, T. (2000): "Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11, 942-950.
- LABAKA, V.R., WEE, Y.J., YE, W. y KORIVI, M. (2021): "Nutritional Composition and Bioactive Compounds in Three Different Parts of Mango Fruit", *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18, 471.
- LACORTE, S. y FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2006): "Time of Flight Mass Spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food", *Mass Spectrometry Reviews*, 25, pp. 866– 880.
- LABAKA, V.R., WEE, Y.J., YE, W. y KORIVI, M. (2021): "Nutritional Composition and Bioactive Compounds in Three Different Parts of Mango Fruit", *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18, 741.
- LI, P., DUAN, Y., GE, H., ZHAN, Y. y WU, X. (2018): "Multiresidue Analysis of 113 Pesticides in Different Maturity Levels of Mangoes Using an Optimized QuEChERS Method with GC-MS/MS and UHPLC-MS/MS", *Food Analytical Methods*, 11, pp. 2742–2757.
- LIN, L., LIN, H., ZHANG, M., DONG, X., YIN, X., QUB, C. y NI, J. (2015): "Types, principle, and characteristics of tandem high-resolution mass spectrometry and its applications", *Royal Society of Chemistry Advances*, 5, pp. 107623-107636.
- LIN, S.Y., HSUA, W.H., LINA, C.C. y CHENF, C.J. (2014): "Mass spectrometry-based proteomics in Chest Medicine, Gerontology, and Nephrology: subgroups omics for personalized medicine", *Biomedicine*, 4, pp. 25-36.
- LLORCA, M. y RODRÍGUEZ-MOZAZ, S. (2013): "State-of-the-art of screening methods for the rapid identification of chemicals in drinking water", *ERNICIP TG Water*.

- LÓPEZ-RUIZ, R. (2020): *Estrategias para el estudio de plaguicidas específicos y sus metabolitos mediante espectrometría de masas de alta resolución*, Tesis Doctoral Universidad de Almería.
- MAKAROV, A. y SCIGELOVA, M. (2010): “Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, 1217, pp. 3938-3945.
- MALDONADO-CELIS, M.E., YAHIA, E.M., BEDOYA, R., LANDÁZURI, P., LOANGO, N., AGUILLÓN, J., RESTREPO, B., y GUERRERO, J.C. (2019): “Chemical Composition of Mango (*Mangifera indica* L.) Fruit: Nutritional and Phytochemical Compounds”, *Frontiers in Plant Science*, 10, 1073.
- MARTÍNEZ-PIERNAS, A.B., POLO-LÓPEZ, M.I., FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, P. y AGÜERA, A (2018): “Validation and application of a multiresidue method based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry for evaluating the plant uptake of 74 microcontaminants in crops irrigated with treated municipal wastewater”, *Journal of Chromatography A*, 1534, pp. 10–21.
- MILLER, J.C. y MILLER, J.N. (2002): “Métodos de calibración en análisis instrumental: regresión y correlación” en MILLER, J.C. y MILLER, J.N. (4ª ed.): *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, Madrid, Prentice Hall.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN (2007): “Material vegetal: mango”, en *Plataforma de conocimiento para el medio rural y pesquero: observatorio de tecnologías probadas*. Disponible en línea: <https://www.mapa.gob.es/app/MaterialVegetal/>.
- MOHAPATRA, S. y LEKHA, S. (2016): “Residue level and dissipation of carbendazim in/on pomegranate fruits and soil”, *Environmental Monitoring and Assessment*, 188, 406.
- NAVICKIENE, S., AQUINO, A. y BEZERRA, D.S.S. (2010): “A Matrix Solid-Phase Dispersion Method for the Extraction of Seven Pesticides from Mango and Papaya”, *Journal of Chromatographic Science*, 78, pp. 750-754.
- OBSERVATORIO DE PRECIOS Y MERCADOS DE LA JUNTA DE ANDALUCÍA (2021): *El cultivo de mango gana terreno en Andalucía*. Disponible en línea: <https://valenciafruits.com/>.
- PASTO, C.H., OZAWA, K.S., BARBOSA, C.M., y GEBARA, A.M. (2015):

“Evaluation of Pesticide Residues in Mango by a Multi-residue Analysis and GC/MS Triple Quadrupole”, *Journal of Agricultural Science and Technology*, 5, pp. 530-536.

- PATEL, M., PATEL, A., PRABHU, P. y PANDYA, M. (2022):” A Fast, Sensitive and Validated Analytical Method for Quantitation of Imidacloprid Pesticide Residual in *Mangifera indica* Matrix by LC-Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS/MS)”, *Asian Journal of Chemistry*, 34, pp. 1660-1664.
- PERESTRELO, R., SILVA, P., PORTP-FIGUEIRA, P., PEREIRA, J.A.M., SILVA, C., MEDIA y CÁMARA, S.J.S.C. (2019): “QuEChERS-Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends”, *Analytica Chimica Acta*, 1170, pp.1-28.
- PÉREZ-ORTEGA, P. (2015): *Desarrollo de bases de datos de masas exactas de iones para el control exhaustivo y automatizado de contaminantes en alimentos mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de alta resolución*, Tesis doctoral, Universidad de Jaén.
- PÉREZ-ORTEGA, P., LARA-ORTEGA, F.J., GARCÍA-REYES, J.F., GILBERT-LÓPEZ, B., TROJANOWICZ, M. y MOLINA-DÍAZ, A. (2016): “A feasibility study of UHPLC-HRMS accurate-mass screening methods for multiclass testing of organic contaminants in food”, *Talanta*, 106, pp. 704-712.
- PÉREZ-ORTEGA, P., LARA-ORTEGA, F.J., GILBERT-LÓPEZ, B., MORENO-GONZÁLEZ, D., GARCÍA-REYES, J.F. y MOLINA-DÍAZ, A. (2017): ”Screening of Over 600 Pesticides, Veterinary Drugs, Food-Packaging Contaminants, Mycotoxins, and Other Chemicals in Food by Ultra-High Performance Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (UHPLC-QTOFMS)”, *Food Analytical Methods*, 10, pp.1216–1244.
- RAINA, R. (2011): “Chemical Analysis of Pesticides Using GC/MS, GC/MS/MS, and LC/MS/MS” en STOYTICHEVA, M. (Intech): *Pesticides - Strategies for Pesticides Analysis*, pp. 105-130.
- REIS-FRÓES, M.B., SANTANA-SANTOS, L.F. y NAVICKIENE, S. (2012): “Multi-Residue Determination of Pesticides in Açai Tropical Fruit (*Euterpe*

oleracea) by Matrix Solid-Phase Dispersion Combined with Liquid Chromatography”, *Food Analytical Methods*, 6, pp. 328-333.

- SANCHO J.V., POZO, O.J, LÓPEZ, F.J y HERNÁNDEZ, F. (2002): “ Different quantitation approaches for xenobiotics in human urine samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry”, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16, 639-645.
- SAVANT, R.H., BANERJEE, K., UTTURE, S.C., PATIL, S.H., DASGUPTA, S., GHASTE, M.S. y ADSULE, P.G. (2010): “Multiresidue Analysis of 50 Pesticides in Grape, Pomegranate, and Mango by Gas Chromatography-Ion Trap Mass Spectrometry”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, pp. 1447–1454.
- SCHYMANSKI, E.L., SINGER, H.P, SLOBODNIK, J., IPOLYI, M.I., OSWALD, P., KRAUSS, M., SCHULZE, T., HAGLUND, P., LETZEL, T., GROSSE, S., TOMAIDIS, N.S., BLETSSOU, A., ZWIENER, C., IBÁÑEZ, M., PORTOLÉS, T., DE-BOER, R., REID, M.J, OHGHENA, M., KUNKEL, U., SCHULZ,W., GUILLON, A., NOYON, N., LEROY, G., BADOS, P., BOGIALLI, S., STIPANCEV, D., ROSTKOWSKI, P. y HOLLENDER, J. (2015): “Non-target screening with high-resolution mass spectrometry: critical review using a collaborative trial on water analysis”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, pp. 6237–6255.
- SIVAPERUMAL, P., SALAUDDIN, A., KUMAR, A.R., SANTHOSH K. y RUPAL, T. (2017): ”Determination of Pesticide Residues in Mango Matrices by Ultra High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry”, *Food Analytical Methods*, 10, pp. 2346–2357.
- SOL, H., MUSFICUR, M., SUK, H., KABIRA, H., YOONB, K.S., CHOC, S.K., ABD, A.M. y SHIMA, J.H. (2018): ”An effective methodology for simultaneous quantification of thiophanate-methyl, and its metabolite carbendazim in pear, using LC-MS/MS”, *Journal of Chromatography B*, 1095, pp. 1-7.
- SONG, S., ZHU, K., HAN, L. , SAPOZHNIKOVA, Y., ZHANG, Z. y YAO, W. (2018): “Residue Analysis of 60 Pesticides in Red Swamp Crayfish Using QuEChERS with High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, pp. 5031–

5038.

- SRIVASTAVA, A.K., RAI, S., SRIVASTAVA, M.K., LOHANI, M., MUDIAM, M.K.R. y SRIVASTAVA, L.P. (2014): "Determination of 17 Organophosphate Pesticide Residues in Mango by Modified QuEChERS Extraction Method Using GC-NPD/GC-MS and Hazard Index Estimation in Lucknow, India", *Plos One*, 9, 5..
- STACHNIUK, A. y FORMAL, E. (2016): "Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food", *Food Analytical Methods*, 9, pp. 1654–1665.
- ŠTAJNBAHER, D. y ZUPANČIČ-KRALJ, L. (2003): "Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, 1015, pp. 185–198.
- UCLÉS, S., HAKME, E., FERRER, C. y FERNÁNDEZ-ALBA, A. (2018): "Analysis of thermally labile pesticides by on-column injection gas chromatography in fruit and vegetables", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410, pp. 6861–6871.
- VARELA-MARTÍNEZ, D.A., GONZÁLEZ-CURBELO, M.A., GONZÁLEZ-SÁLAMO, J. y HERNÁNDEZ-BORGES, J. (2020): "Analysis of pesticides in cherimoya and gulupa minor tropical fruits using AOAC 2007.1 and ammonium formate QuEChERS versions: A comparative study", *Microchemical Journal*, 157, 104950.
- WAHAB, S., M.D.F. y AHMAD, W. (2022): "Advancement and New Trends in Analysis of Pesticide Residues in Food: A Comprehensive Review", *Plants*, 11, 1106.
- YANG, X., LUO, J., LI, S. y LIU, C. (2016): "Evaluation of nine pesticide residues in three minor tropical fruits from southern China", *Food Control*, 60, pp. 677-682.
- YURA, W.R., MUHAMMAD, F.R., MIRZA, F.F., MAUREND, Y.L., WIDYANTORO, W., FARIDA, S.S., AZIZ, Y.P., DESTI, A., EDY, W., SEPTY, M., SUTRA, D., ALIFIA, I.B., NANDA, I.V.M. y FIKRI, E., (2021): "Pesticide residues in food and potential risk of health problems: a systematic literature review", *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 894.