

Atendiendo al creciente interés de Ecuador en el establecimiento de políticas para el control de residuos de plaguicidas debido al elevado uso de productos fitosanitarios en el tratamiento de enfermedades de diversos cultivos, particularmente, en el caso de fungicidas utilizados en el control de la Sigatoka Negra, enfermedad que afecta al banano. Considerando, además, la repercusión que han tenido estos fungicidas en el medio ambiente, tal y como se manifestó con la aparición del denominado Síndrome de Taura, causante de la mortandad masiva de camarón en piscinas de cultivo próximas a las plantaciones bananeras, lo que causó una fuerte polémica entre estos dos importante sectores de la economía ecuatoriana. Teniendo en cuenta, también, que el nivel de exportación de cítricos en España, así como de bananas en Ecuador, demanda la aplicación de fungicidas post-cosecha, requiriéndose el control de residuos a efectos de comercialización de las frutas. Y considerando que uno de los temas que más preocupa a la opinión pública, en general, es la presencia de residuos de estas sustancias en alimentos tratados, sobretodo frutas y hortalizas, puesto que incide directamente en la seguridad alimentaria.

La presente Tesis Doctoral se centra, por tanto, en el desarrollo de una metodología analítica moderna acorde con el estado tecnológico actual y con las exigencias que demanda la legislación en materia de residuos de plaguicidas y, también, de metodología más convencional factible de aplicación en medios de investigación menos desarrollados.

De esta manera se han desarrollado varios métodos analíticos mediante técnicas cromatográficas avanzadas (LC-FD, GC-MS, LC-LC-FD, LC-MS/MS) para la determinación de residuos de fungicidas seleccionados en muestras de banana y naranjas.

Se ha demostrado la aplicabilidad de los métodos desarrollados en muestras de naranjas y bananas, confirmándose la idoneidad de los métodos multiresiduos para fines de control (*monitoring*). Para la determinación selectiva de o-fenilfenol se recomienda la aplicación del método LC-LC/FD, más rápido, sensible y selectivo que los multiresiduos. Finalmente, la poderosa técnica LC-MS/MS ha permitido determinar tridemorf y otros fungicidas y, así como confirmar los resultados obtenidos con los métodos más convencionales descartando la existencia de falsos positivos.

Adicionalmente, se ha desarrollado metodología analítica basada en LC-MS para la determinación de residuos de paclobutrazol, regulador de crecimiento ampliamente utilizado en frutas de hueso, por la necesidad de disponer de datos de residuos de este compuesto, cuyo LMR ha sido recientemente rebajado hasta $0.05 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, lo cual ha originado graves problemas en la exportación de peras españolas. Este compuesto también presenta propiedades fungicidas, pudiendo incluirse en el grupo de los azoles según su estructura química.



Departament de Ciències Experimentals
Química Analítica

**DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE FUNGICIDAS EN
PRODUCTOS VEGETALES MEDIANTE TÉCNICAS
CROMATOGRÁFICAS AVANZADAS**

**Tesis Doctoral
Tatiana Zamora Zamora
Junio 2004**

Dr. Félix Hernández Hernández, Catedrático de Química Analítica, y Dr. Francisco López Benet, Profesor Titular de Química Analítica, de la Universitat Jaume I de Castellón,

Certifican: que la Tesis Doctoral “ *Determinación de residuos de fungicidas en productos vegetales mediante técnicas cromatográficas avanzadas*” ha sido desarrollada bajo su dirección, en el área de Química Analítica del Departamento de Ciències Experimentals de la Universitat Jaume I de Castellón, por Doña Tatiana Zamora Zamora.

Lo que certificamos para los efectos oportunos en Castellón de la Plana, a 12 de marzo de 2004.

Fdo. Dr. Félix Hernández Hernández

Fdo. Dr. Francisco López Benet

La realización de la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el marco del Convenio de colaboración entre la Universidad Jaume I de Castellón, Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) y Universidad Guayaquil (UG), y con el apoyo de la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), a través de una beca del Programa General de Becas para Extranjeros desde noviembre de 1999 hasta marzo de 2003.

También ha sido posible gracias al apoyo otorgado a través del “Programa de Maestría en Agricultura Tropical Sostenible” de la UG y la ESPOL de Ecuador, bajo la dirección del Dr. Wilson Pozo G. Además, con la ayuda brindada por el Proyecto GEF/2732-02-4456: “Inventario Preliminar de Emisiones de Dioxinas y Furanos (D&F) en el Ecuador” del Ministerio de Medio Ambiente de Ecuador, bajo la dirección del Ing. Mariano Montaña A. Y, con el valioso apoyo del Decano de la Facultad de Ciencias Naturales de la UG, Ing. José Cuenca.

Agradecimientos

Bien sabido es que la realización de una Tesis Doctoral no es tarea fácil para quien emprende este camino y debo decir que hacerla lejos de casa resulta aún menos fácil. Ello encierra más allá de la formación académica, una formación personal. Por eso, quiero aprovechar la ocasión para darle mi agradecimiento sincero a las personas que me han apoyado tanto durante este episodio de mi vida...

En primer lugar mi agradecimiento al Dr. Félix Hernández, porque me abrió las puertas y me brindó la posibilidad de realizar la presente Tesis Doctoral bajo su dirección. Así como también quiero agradecer a mi tutor, el Dr. Francisco López, por la atención, por la guía y el apoyo que me ha prestado siempre, sobretodo en la última etapa de la Tesis, y porque no le habrá sido fácil leer en “ecuatoriano”.

Mi sincero agradecimiento también para los profesores del Departamento, Toni Roig, Ximo Beltrán, Juan Vicente Sancho, Roque Serrano e Ignacio Morell. Y de manera especial para mis compañeros Carmen Hidalgo, Elena Pitarch y Oscar Pozo, porque en el desarrollo de esta tesis el aporte de sus conocimientos y experiencia fue fundamental para el avance de mi trabajo.

A mis amigas Sonia Egea, Mercedes, Susana y Cruchenka, por el día a día, porque han sido consejo, cariño y palabra cuando más las he necesitado. A mis buenos compañeros de Química Analítica: Robert, Jose Marín, María Ibañez, Arantxa, Laura, Carlos, Miguel Angel, Tania y Elena Serrano por sus ánimos y por estar pendientes. Así como a quienes ya no están y deseo recordar: María Forcada, Jose Gaspar, Ana Cabanes, Alicia, Angela y Sonia Fuster. También me gustaría agradecer al resto de compañeros que hacen Ciencias Experimentales.

Un profundo agradecimiento a la familia Pitarch, a mi querida amiga Elena, especialmente gracias por permitirme, además, ser parte de su familia, por dejarme compartir momentos importantes y por esos deliciosos domingos con sabor a paella.

Gracias a la valiosa amistad de Yolanda, por los buenos momentos que fueron todos y por la ayuda brindada durante mi adaptación en España. A Argelio, Eva y Roberto, por la cálida amistad compartida que ha sido la fábrica de tantos recuerdos gratos que llevo conmigo. A mi querida comunidad mexicana con la que he compartido casa, amistad, sentimientos, tradiciones, indescriptibles momentos de buena

compañía y más, a Javier, Yleana, Rita y, especialmente a mi querida Lilia: gracias mil simplemente por coincidir. A mi Claus, parte de esa comunidad latinoamericana de la c/ M. Bretón, gracias por dejarse oír y sobretodo sentir siempre tan cerca. A Nicolas, por su bonita amistad, por aquella navidad y por su "Sur Francia". A mi casi compatriota Hege, por todo lo compartido y por su bonito Bergen. A Susana Castro, la Pamela, la Sandra, Ivana, Vincenzo, Ana Rivas, Rebeca y Pepito, Analía y Edgardo, porque han significado momentos especiales y por el gusto de haberles conocido.

Un agradecimiento especial a quienes les debo en gran parte el haber llegado hasta aquí, al Ing. Mariano Montaña y al Dr. Wilson Pozo, gracias por la insistencia, por los buenos votos y por el apoyo que me han brindado siempre.

Pero sobretodo, gracias a mi madre, por su amor, por su apoyo y paciencia, porque estos cuatro años le han sabido también a sacrificio. A mi hermano que no sólo ha sido apoyo, sino compañía diaria a pesar de la distancia. A mi padre por sus bendiciones y mucho más. Y a toda mi familia, y amigos, porque no es fácil estar tanto tiempo lejos de los suyos y ellos han estado ahí... conmigo.

Y aún podría seguir diciendo gracias, moltes gràcies a tots!...

INDICE

OBJETIVOS DE LA TESIS. PLAN DE TRABAJO	3
CAPITULO 1. Introducción general	9
1.1. Introducción	11
1.2. Uso de fungicidas en productos vegetales	19
1.2.1. Plaguicidas y residuos de plaguicidas	21
1.2.2. Toxicidad de los plaguicidas.....	24
1.2.3. Residuos de plaguicidas en alimentos.....	25
1.2.4. Normativa legal sobre residuos de plaguicidas	28
1.2.5. Fungicidas	31
1.2.6. Selección de fungicidas a estudiar	34
1.2.7. Referencias	43
1.3. Análisis de residuos de fungicidas	45
1.3.1. Métodos multiresiduos.....	51
1.3.2. Métodos más selectivos.....	58
1.3.3. Referencias	79
CAPITULO 2. Métodos multiresiduales para la determinación de fungicidas.....	91
2.1. Introducción	93
2.2. Determinación de fungicidas por cromatografía líquida con detector de fluorescencia y barrido de diodos (LC-FD/DAD).....	98
2.2.1. Experimental	99
2.2.2. Resultados y Discusión.....	104
2.2.3. Validación del método de análisis	130
2.2.4. Aplicación a muestras reales.....	134
2.3. Determinación de residuos de fungicidas por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS).....	140
2.3.1. Experimental	142
2.3.2. Resultados y Discusión.....	146
2.3.3. Validación del método de análisis	165
2.3.4. Aplicación a muestras reales.....	177

2.3.5. Confirmación mediante cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas en tandem (GC-MS/MS)	181
2.4. Referencias	185
CAPITULO 3. Determinación de fungicidas mediante acoplamiento LC-LC ..	189
3.1. Introducción	191
3.1.1. Acoplamiento LC-LC	191
3.1.2. Referencias	199
3.2. Experimental. Determinación de residuos de fungicidas mediante cromatografía líquida con columnas acopladas (LC- LC/FD)	202
3.2.1. Optimización de condiciones cromatográficas	202
3.2.2. Características analíticas	205
➤ <i>Artículo científico “Determination of fungicide residues in fruits by coupled-column liquid chromatography”</i>	210
CAPITULO 4. Determinación de tridemorf y otros fungicidas mediante acoplamiento LC-MS/MS	227
4.1. Introducción	229
4.2. Experimental. Determinación de residuos de tridemorf y otros fungicidas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS)	235
4.1.2. Optimización de condiciones de MS	235
4.2.2. Tratamiento de la muestra	240
4.2.3. Aplicación a muestras reales	241
➤ <i>Artículo científico “Residue determination of tridemorf and other fungicides in fruit samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry”</i>	243
4.3. Comparación de los resultados obtenidos en el análisis de muestras reales mediante los diversos métodos desarrollados	261
CAPITULO 5. Determinación de paclobutrazol mediante acoplamiento LC- MS/MS	269
5.1. Introducción	271
5.2. Experimental. Determinación de residuos de paclobutrazol en peras mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS)	277
➤ <i>Artículo científico “Direct determination of paclobutrazol residues in pear samples by liquid chromatography- electrospray tandem mass spectrometry”</i>	278
CAPITULO 6. Conclusiones	291

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.	Distribución actual de la sigatoka amarilla y negra	12
Figura 1.2.	Consumo de plaguicidas por tipo de sustancias a nivel mundial en el año 2001	19
Figura 1.3.	Porcentajes de tipo de plaguicidas utilizados en España en el año 2002	20
Figura 1.4.	Esquema de fijación de los LMR.....	30
Figura 1.5.	Anillo de bencimidazol	39
Figura 1.6.	(a) Anillo de 1,2,4-triazol, (b) anillo de imidazol	40
Figura 1.7.	Anillo de morfolina.....	42
Figura 2.1.	Espectros de absorción de disoluciones patrón de 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de concentración de carbendazima, tiabendazol, o-fenilfenol y bitertanol	105
Figura 2.2.	Cromatograma LC-FD de una disolución de mezcla de fungicidas de 400 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, utilizando como fase móvil gradiente de acetonitrilo y solución tampón de KH_2PO_4 a pH 4 (a), pH 7 (b) y $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ a pH 7 (c)	107
Figura 2.3.	Cromatograma LC correspondiente a una disolución patrón de 200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de los fungicidas seleccionados, con las condiciones cromatográficas optimizadas	108
Figura 2.4.	Curvas de calibrado correspondientes a los fungicidas seleccionados obtenidas mediante LC-FD	110
Figura 2.5.	Cromatograma LC-DAD correspondiente a una mezcla de patrones de 200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ después de purificación en cartuchos de fase diol. (A) en metanol y (B) en hexano-diclorometano (7:3)	115
Figura 2.6.	Esquema del procedimiento recomendado para la purificación de extractos de naranja y banana en cartuchos diol de 500 mg.....	116
Figura 2.7.	Cromatogramas LC correspondientes a un extracto de naranja fortificado a 200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ con los fungicidas seleccionados comparado con su respectivo blanco. (A) DAD y (B) FD	118
Figura 2.8.	Comparación del espectro de absorción de un interferente presente en una muestra blanco de naranja co-eluido junto con o-fenilfenol. Detección por DAD.....	119
Figura 2.9.	Cromatogramas LC-DAD correspondientes a un extracto de naranja fortificado a un nivel de 20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ con los	

	fungicidas seleccionados. Interferentes que co-eluyen con MBC y TBZ	119
Figura 2.10.	Cromatograma LC-FD correspondiente a una disolución patrón inyectada con un 50% (a) y 100% (b) de metanol	121
Figura 2.11.	Cromatogramas LC-FD correspondientes a un extracto de muestra de naranja fortificada equivalente a 3.2, 2.6, 1.6, 0.6 mg·Kg ⁻¹ sin purificación (a) y con purificación mediante SPE con cartucho diol de 500 mg (b).....	123
Figura 2.12.	Cromatograma LC-FD correspondiente a un extracto blanco de banana fortificado a 10 ng·mL ⁻¹ (a) y el extracto blanco sin fortificar (b)	124
Figura 2.13.	Cromatograma LC-FD correspondientes a un extracto blanco de banana sin purificación (a), y con purificación (b) por SPE con cartuchos de fase diol y, a una disolución patrón con los fungicidas seleccionados.....	125
Figura 2.14.	Cromatograma LC-FD. Comparación entre extracto blanco de (a) banana y (b) plátano.....	126
Figura 2.15.	Esquema del procedimiento aplicado para la etapa extracción de fungicidas en muestras de naranja y banana	128
Figura 2.16.	Esquema del procedimiento aplicado para la etapa purificación de fungicidas en muestras de naranja y banana	129
Figura 2.17.	Cromatogramas LC-FD correspondientes (a) a una muestra de naranja fortificada a 0.2 mg·Kg ⁻¹ (MBC y TBZ), 0.1 mg·Kg ⁻¹ (OPP) y 0.05 mg·Kg ⁻¹ (bitertanol) y (b) un blanco de muestra	132
Figura 2.18.	Cromatogramas LC-FD correspondientes (a) a una muestra de naranja fortificada a 0.5 mg·Kg ⁻¹ (MBC) y 0.6 mg·Kg ⁻¹ (TBZ) y (b) un blanco de muestra	133
Figura 2.19.	Cromatogramas LC-FD correspondientes (a) a una muestra de banana fortificada a 0.2 mg·Kg ⁻¹ (MBC y TBZ), 0.1 mg·Kg ⁻¹ (OPP) y 0.05 mg·Kg ⁻¹ (bitertanol) y (b) un blanco de muestra	133
Figura 2.20.	Cromatograma LC-FD correspondiente a la muestra naranja 2	136
Figura 2.21.	Cromatograma LC-FD correspondiente a la muestra banana 4	137
Figura 2.22.	Resultados del análisis de muestras reales de naranjas y bananas relativos al contenido de tiabendazol (método LC-FD)	138
Figura 2.23.	Resultados del análisis de muestras reales de naranjas relativos al contenido de o-fenilfenol (método LC-FD).....	138

Figura 2.24.	Resultados del análisis de muestras reales de bananas relativos al contenido de bitertanol (método LC-FD)	139
Figura 2.25.	Cromatogramas GC-MS (modo SIM) de una disolución patrón de 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de OPP, dicloran, clorotalonil, tiabendazol, imazalil, propiconazol y bitertanol	146
Figura 2.26.	Espectros de masas correspondientes a los fungicidas seleccionados	147
Figura 2.27.	Cromatogramas GC-MS (<i>extract ion</i>) correspondientes a una disolución mezcla de patrón de 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de OPP, dicloran, clorotalonil, tiabendazol, propiconazol, bitertanol y 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de imazalil	150
Figura 2.28.	Curvas de calibrado para los fungicidas seleccionados obtenidos a partir de disoluciones hexánicas de patrón inyectadas en el sistema GC-MS (modo <i>extract ion</i>)	154
Figura 2.29.	Esquema de las condiciones optimizadas para la etapa de extracción	155
Figura 2.30.	Cromatograma GC-MS (modo SIM) de un extracto de naranja fortificado a 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con OPP, dicloran, clorotalonil, tiabendazol, propiconazol, bitertanol y 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de imazalil, inyectado sin carbofrit (A) y con carbofrit (B)	157
Figura 2.31.	Esquema del procedimiento recomendado para la purificación de extractos de naranja y banana mediante cartuchos de Florisil 1 g	160
Figura 2.32.	Cromatogramas GC-MS (modo SIM) correspondientes a (A) un extracto de naranja fortificado a una concentración equivalente a 2 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de OPP, dicloran, clorotalonil, tiabendazol, propiconazol, bitertanol y 4 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de imazalil	161
Figura 2.33.	Esquema del procedimiento aplicado para la etapa de extracción de fungicidas en muestras de naranja y banana .	163
Figura 2.34.	Esquema del procedimiento aplicado para la etapa de purificación de extractos de naranja y banana	164
Figura 2.35.	Cromatogramas GC-MS (modo SIM) de (A) un patrón en matriz correspondiente a 2 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de OPP, dicloran, clorotalonil, tiabendazol, propiconazol, bitertanol y 4 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de imazalil, y (B) de una disolución patrón de concentración equivalente (1-2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	165
Figura 2.36.	Curvas de calibrado correspondientes a la determinación de los fungicidas en naranja mediante GC-MS	167
Figura 2.37.	Curvas de calibrado correspondientes a la determinación de los fungicidas en banana mediante GC-MS	168
Figura 2.38.	Cromatogramas GC-MS (<i>extract ion</i>) correspondientes a una muestra de naranja fortificada a 0.05 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ con OPP, dicloran, clorotalonil, propiconazol y bitertanol	174

Figura 2.39.	Cromatogramas GC-MS (<i>extract ion</i>) correspondientes a una muestra de naranja fortificada a 0.5 mg·Kg ⁻¹ de tiabendazol y 1 mg·Kg ⁻¹ imazalil	175
Figura 2.40.	Cromatogramas GC-MS (<i>extract ion</i>) correspondientes a una muestra de banana fortificada a 0.5 mg·Kg ⁻¹ de tiabendazol y 1 mg·Kg ⁻¹ imazalil	175
Figura 2.41.	Cromatogramas GC-MS (<i>extract ion</i>) correspondientes a una muestra de banana fortificada a 0.05 mg·Kg ⁻¹ con OPP, dicloran, clorotalonil, propiconazol y bitertanol	176
Figura 2.42.	Cromatograma GC-MS (<i>extract ion</i>) para la muestra banana 7	178
Figura 2.43.	Cromatograma GC-MS (<i>extract ion</i>) para la muestra naranja 13	179
Figura 2.44.	Resultados del análisis de muestras reales de naranjas con respecto a tiabendazol e imazalil (método GC-MS)	180
Figura 2.45.	Resultados del análisis de muestras reales de bananas con respecto a tiabendazol (método GC-MS)	180
Figura 2.46.	Resultados del análisis de muestras reales de bananas con respecto a bitertanol (método GC-MS).....	181
Figura 2.47.	Cromatogramas GC-MS/MS correspondiente a la muestra banana 6	183
Figura 2.48.	Cromatogramas GC-MS/MS correspondiente a la muestra naranja 13	184
Figura 3.1.	Representación esquemática de un acoplamiento LC-LC	192
Figura 3.2.	Etapas de un procedimiento basado en el acoplamiento LC-LC.	194
Figura 3.3.	Cromatograma LC correspondiente a una disolución patrón de 400 ng·mL ⁻¹ de OPP, obtenido con C-1 conectada al detector FD	204
Figura 3.4.	Curvas de calibrado correspondientes a OPP y bitertanol, obtenidas mediante LC-LC/FD	206
Figura 3.5.	Cromatograma LC-LC/FD correspondiente a una disolución patrón de 4 ng·mL ⁻¹ de OPP y bitertanol.....	208
Figura 3.6.	Resultados del análisis de muestras mediante el método LC-LC/FD.....	209
Figura 4.1.	Ruta de fragmentación propuesta para propiconazol	237
Figura 4.2.	Ruta de fragmentación propuesta para carbendazima	238
Figura 4.3.	Rutas de fragmentación propuestas para tiabendazol.....	238
Figura 4.4.	Rutas de fragmentación propuestas para imazalil.....	239
Figura 4.5.	Rutas de fragmentación propuestas para bitertanol.....	239

Figura 4.6.	Resultados del análisis de muestras reales de bananas mediante LC-MS/MS con respecto a tiabendazol, imazalil y bitertanol	241
Figura 4.7.	Resultados del análisis de muestras reales de naranjas mediante LC-MS/MS con respecto a tiabendazol e imazalil	242
Figura 5.1.	Estructura química del paclobutrazol	271

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.	Enfermedades ocasionadas por hongos en cítricos.....	15
Tabla 1.2.	Límites máximos de residuos ($\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$) de algunos fungicidas para bananas y naranjas	16
Tabla 1.3.	Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad.....	24
Tabla 1.4.	Características de los fungicidas seleccionados.....	35
Tabla 1.5.	Métodos multiresiduos para la determinación de fungicidas de interés	55
Tabla 1.6.	Métodos de análisis para la determinación de los fungicidas seleccionados	67
Tabla 2.1.	Identificación y características de muestras reales de naranjas utilizadas para la aplicación de los métodos de análisis desarrollados	102
Tabla 2.2.	Identificación y características de muestras reales de bananas utilizadas para la aplicación de los métodos de análisis desarrollados	102
Tabla 2.3.	Fortificación de las muestras blanco para la validación del método.....	103
Tabla 2.4.	Longitudes de onda seleccionadas para su estudio por LC-DAD/FD	105
Tabla 2.5.	Gradiente seleccionado como fase móvil para la determinación cromatográfica de los fungicidas seleccionados en columna Kromasil C_{18}	107
Tabla 2.6.	Repetibilidad y precisión intermedia del método cromatográfico LC-FD	109
Tabla 2.7.	Linealidad y límites de detección mediante inyección directa de las disoluciones patrón en el sistema LC-FD.....	110
Tabla 2.8.	Recuperación (%) de patrones de fungicidas ($200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) en distintos disolventes, purificados mediante SPE en cartuchos de fase diol	113
Tabla 2.9.	Recuperación (%) de patrones de fungicidas ($200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) sometidos al proceso de purificación mediante SPE en cartuchos de fase diol	114
Tabla 2.10.	Recuperación (%) y desviación estándar relativa en patrones en $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, purificados mediante SPE con cartuchos diol (500 mg) de acuerdo a las condiciones de purificación optimizadas	116

Tabla 2.11.	Recuperación (%) de fungicidas a partir de muestras blanco de naranja fortificadas usando diferentes disolventes de extracción	120
Tabla 2.12.	Recuperaciones (%) y desviación estándar relativa para los fungicidas analizados mediante LC-FD en muestras fortificadas de naranja. Límites de detección y cuantificación	131
Tabla 2.13.	Recuperaciones (%) y desviación estándar relativa para los fungicidas analizados mediante LC-FD en muestras fortificadas de banana. Límites de detección y cuantificación	131
Tabla 2.14.	Concentración de los fungicidas en las muestras de naranja analizadas mediante el método LC-FD	135
Tabla 2.15.	Concentración de los fungicidas en las muestras de naranja analizadas mediante el método LC-FD	135
Tabla 2.16.	Iones seleccionados para la determinación de los fungicidas mediante GC.MS en modo SIM	149
Tabla 2.17.	Linealidad y LOD obtenidas con disolución patrón mediante GC-MS con detección en modo extract ion.....	153
Tabla 2.18.	Recuperación (%) de fungicidas en extracto de naranja fortificado a una concentración equivalente a $2 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, sometido a purificación por SPE en cartuchos de sílica.....	158
Tabla 2.19.	Recuperación (%) de fungicidas en extracto de naranja fortificado a una concentración equivalente a $2 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, sometido a purificación por SPE en cartuchos de Florisil.....	159
Tabla 2.20.	Estudio de la linealidad para la determinación de los fungicidas seleccionado en naranjas mediante GC-MS.....	169
Tabla 2.21.	Estudio de la linealidad para la determinación de los fungicidas seleccionado en bananas mediante GC-MS.....	169
Tabla 2.22.	Linealidad del calibrado en matriz de naranja para propiconazol y bitertanol en intervalos de concentración reducidos	170
Tabla 2.23.	Recuperación (%) y desviación estándar relativa para la determinación de los fungicidas seleccionados en muestras fortificadas de naranja mediante GC-MS.....	171
Tabla 2.24.	Recuperación (%) y desviación estándar relativa para la determinación de los fungicidas seleccionados en muestras fortificadas de banana mediante GC-MS	171
Tabla 2.25.	Precisión intermedia (%) para la determinación de los fungicidas seleccionados en muestras fortificadas de naranja y banana mediante GC-MS	171
Tabla 2.26.	Concentración de fungicidas en muestras reales de naranja obtenidas mediante aplicación del método GC-MS.....	177

Tabla 2.27.	Concentración de fungicidas en muestras reales de banana obtenidas mediante aplicación del método GC-MS.....	178
Tabla 2.28.	Condiciones para la detección por MS/MS de los fungicidas seleccionados.....	182
Tabla 2.29.	Concentración estimada de fungicidas en muestras reales analizadas mediante GC-MS/MS.....	182
Tabla 3.1.	Condiciones seleccionadas de acoplamiento y análisis LC-LC.....	205
Tabla 3.2.	Estudio de la linealidad del método LC-LC/FD para la determinación de OPP y bitertanol.....	207
Tabla 4.1.	Iones (m/z) seleccionados para la detección MS en modo SIM de los fungicidas seleccionados.....	236
Tabla 4.2.	Recuperación (%) de fungicidas a partir de muestras fortificadas a 1 mg·Kg ⁻¹ usando diferentes disolventes de extracción. Determinación por LC-MS/MS.....	240
Tabla 4.3.	Resultados cualitativos en muestras reales de banana analizadas mediante los diversos métodos desarrollados.....	262
Tabla 4.4.	Resultados cualitativos en muestras reales de naranja analizadas mediante los diversos métodos desarrollados.....	263
Tabla 4.5.	Concentraciones obtenidas en muestras reales de banana analizadas mediante los diversos métodos desarrollados.....	265
Tabla 4.6.	Concentraciones obtenidas en muestras reales de naranja analizadas mediante los diversos métodos desarrollados.....	266
Tabla 5.1.	Límites máximos de residuos de paclobutrazol en peras para diferentes países.....	273

INDICE DE ABREVIATURAS

Ace	Acetona
AcEt	Acetato de Etilo
ACN	Acetonitrilo
ADI	<i>Admissible Daily Ingestion</i>
AEPLA	Asociación Empresarial para la Protección de las Plantas
AOAC	<i>Association Official Analytical Chemists</i>
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
ASE	<i>Accelerated Solvent Extraction</i>
ARP	Análisis de Residuos de Plaguicidas
ASPEC	<i>Automatic Sample Processor system using Enrichment Column</i>
BIT	Bitertanol
CCPR	<i>Codex Committee on Pesticide Residues</i>
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i>
CI	<i>Chemical Ionization</i>
Ciclohx	Ciclohexano
CL50	Concentración Letal para el 50% de la población
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
DCM	Diclorometano
DFG	<i>Deutsche Forschungsgemeinschaft</i>
DL50	Dosis Letal para el 50% de la población
DMF	Dimetilformamida
ECD	<i>Electron Capture Detector</i>
EI	<i>Electron Impact</i>
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>

ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FAO	<i>Food and Agricultural Organization of the United Nations</i>
FD	<i>Fluorescence Detector</i>
FID	<i>Flame Ionization Detector</i>
FPD	<i>Flame Photometric Detector</i>
FSIS	<i>Food Safety and Inspection Service</i>
GC	<i>Gas Chromatography</i>
GPC	<i>Gel Permeation Chromatography</i>
Hx	Hexano
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRW	<i>Human Rights Watch</i>
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LC-LC	<i>Liquid Chromatography-Liquid Chromatography</i>
LMR	Límite Máximo de Residuos
LOD	<i>Limit of Detection</i>
LOQ	<i>Limit of Quantification</i>
LP-GC-MS	<i>Low Pressure-Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
MASE	<i>Microwave Accelerated Solvent Extraction</i>
MBC	Carbendazima
MECK	<i>Micellar Electrokinetic Chromatography</i>
MRM	<i>Multiresidue Method</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	<i>Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i>
MSPD	<i>Matrix Solid Phase Dispersion</i>
NCI	<i>Negative Chemical Ionization</i>
NOEL	<i>Non Observable Effect Level</i>
NPD	<i>Nitrogen Phosphorus Detector</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud

OPP	o-Fenilfenol
PAM	<i>Pesticide Analytical Method</i>
PCI	<i>Positive Chemical Ionization</i>
PSD	<i>Pesticide Safety Directorate of United Kingdom</i>
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i>
SBSE	<i>Stir-Bar Sorptive Extraction</i>
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i>
SIM	<i>Select Ion Monitoring</i>
SIR	<i>Single Ion Recording</i>
S/N	Señal/Ruido
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
SPME	<i>Solid Phase Micro Extraction</i>
SRM	<i>Single Residue Method</i>
TBZ	Tiabendazol
TSD	<i>Thermionic Specific Detector</i>
UE	Unión Europea
UV	<i>Ultraviolet</i>

OBJETIVOS DE LA TESIS. PLAN DE TRABAJO

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Atendiendo al creciente interés de Ecuador en el establecimiento de políticas para el control de residuos de plaguicidas debido al elevado uso de productos fitosanitarios en el tratamiento de enfermedades de diversos cultivos, particularmente, en el caso de fungicidas utilizados en el control de la Sigatoka Negra, enfermedad que afecta al banano. Considerando, además, la repercusión que han tenido estos fungicidas en el medio ambiente, tal y como se manifestó con la aparición del denominado Síndrome de Taura, causante de la mortandad masiva de camarón en piscinas de cultivo próximas a las plantaciones bananeras, lo que causó una fuerte polémica entre estos dos importante sectores de la economía ecuatoriana. Teniendo en cuenta, también, que el nivel de exportación de cítricos en España, así como de bananas en Ecuador, demanda la aplicación de fungicidas post-cosecha, requiriéndose el control de residuos a efectos de comercialización de las frutas. Y considerando que uno de los temas que más preocupa a la opinión pública, en general, es la presencia de residuos de estas sustancias en alimentos tratados, sobretodo frutas y hortalizas, puesto que incide directamente en la seguridad alimentaria.

Se plantea, como **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral, el desarrollo de una metodología analítica moderna, mediante aplicación de cromatografía de gases (GC) y cromatografía líquida (LC), para la determinación de una serie de fungicidas de amplia utilización en productos agrícolas tales como naranjas y bananas.

El objetivo fundamental incluye el desarrollo de metodologías de análisis avanzadas, acordes con el estado tecnológico actual y con las exigencias que demanda la legislación en materia de residuos de plaguicidas y, también, de metodología más convencional factible de aplicación en medios de investigación menos desarrollados. De este manera, se pretende así mismo la transferencia de las metodologías desarrolladas a centros de investigación en países interesados, como Ecuador, de modo que puedan llegar a implementarse en la medida de lo posible, ayudando así al control de residuos de fungicidas, o de otros tipos de

plaguicidas que pudiera resultar de interés en los cultivos más importantes para el país.

Para ello, se han seleccionado los fungicidas de mayor aplicación en bananas y en naranjas y se ha estudiado en detalle su determinación, a nivel de residuos, mediante diversas técnicas analíticas, basadas en el uso tanto de GC como de LC, con distintos tipos de detectores, incluyendo espectrometría de masas (MS). Mención especial merece el fungicida tridemorf, posiblemente el más usado en bananas de Ecuador, para el cual no existen métodos de análisis a nivel de residuos en la literatura científica.

Adicionalmente, se ha desarrollado metodología analítica basada en LC-MS para la determinación de residuos de paclobutrazol, regulador de crecimiento ampliamente utilizado en frutas de hueso, por la necesidad de disponer de datos de residuos de este compuesto, cuyo LMR ha sido recientemente rebajado hasta $0.05 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, lo cual ha originado graves problemas en la exportación de peras españolas. Este compuesto también presenta propiedades fungicidas, pudiendo incluirse en el grupo de los azoles según su estructura química.

El objetivo general presentado en este trabajo se puede desglosar en los siguientes **objetivos específicos**:

- Desarrollo de un método multiresiduo para la determinación de residuos de carbendazima, tiabendazol, o-fenilfenol y bitertanol en naranjas y bananas mediante LC-FD/DAD.
- Desarrollo de un método multiresiduo para la determinación de residuos de o-fenilfenol, dicloran, clorotalonil, tiabendazol, imazalil, propiconazol y bitertanol en naranjas y bananas mediante GC-MS.
- Desarrollo de un método de análisis más efectivo para la determinación de residuos de o-fenilfenol y bitertanol en naranjas y bananas mediante acoplamiento LC-LC con detección por fluorescencia.
- Desarrollo de un método de análisis multiresiduo que permita la determinación y confirmación de residuos de tridemorf, carbendazima, tiabendazol, imazalil, propiconazol y bitertanol en naranjas y bananas mediante LC-MS/MS.

- Desarrollo de un método de análisis que permita la determinación de residuos de paclobutrazol en peras mediante LC-MS.
- Aplicación de los métodos desarrollados a muestras reales de distinta procedencia; estudio comparativo de los métodos aplicados y de los resultados obtenidos en muestras reales; confirmación de los fungicidas detectados mediante LC-MS/MS.

Para conseguir los objetivos anteriormente indicados se detalla el **plan de trabajo** seguido en la presente Tesis Doctoral.

- Selección de los fungicidas a estudiar, en función de la importancia que revisten por su frecuente utilización en los cultivos de interés.
- Selección de las matrices a estudiar, en función de la importancia económica que presentan dentro del comercio de frutas a nivel internacional, y de acuerdo a la demanda de mayor consumo por parte de la población.
- Revisión bibliográfica sobre los antecedentes y estado actual de la determinación de los fungicidas seleccionados en frutas y vegetales.
- Estudio de las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación de tridemorf, imazalil, tiofanato de metilo, benomilo, carbendazima, tiabendazol, o-fenilfenol y bitertanol por LC.
- Estudio de las condiciones cromatográficas óptimas y de los espectros de masas para la determinación de o-fenilfenol, dicloran, clorotalonil, tiabendazol, imazalil, propiconazol, bitertanol y tridemorf mediante GC-MS.
- Estudio de las etapas de extracción con disolventes y de purificación de los extractos de naranja y bananas mediante extracción en fase sólida (SPE) para la optimización de la preparación de las muestras previa a la respectiva determinación cromatográfica (LC y GC).
- Optimización y validación del método multiresiduo, basado en extracción convencional y purificación por SPE, para la determinación de fungicidas seleccionados (carbendazima, tiabendazol, o-fenilfenol y bitertanol) por LC-FD/DAD, mediante experiencias de recuperación en muestras de naranja y banana fortificadas a varios niveles de concentración.

- Aplicación del método LC-FD/DAD desarrollado a muestras reales.
- Optimización y validación del método multiresiduo, basado en extracción convencional y purificación por SPE, para la determinación de fungicidas seleccionados (o-fenilfenol, clorotalonil, dicloran, tiabendazol, imazalil, propiconazol y bitertanol) por GC-MS, mediante experiencias de recuperación en muestras de naranja y banana fortificadas a varios niveles de concentración.
- Aplicación del método GC-MS desarrollado a muestras reales.
- Estudio de las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación de residuos de o-fenilfenol mediante acoplamiento LC-LC; optimización de las condiciones de acoplamiento y evaluación de las principales características analíticas del método desarrollado; validación del método mediante experiencias de recuperación de muestras de naranja fortificadas a varios niveles de concentración.
- Ampliación del campo de aplicación del método LC-LC desarrollado a muestras de banana para la determinación simultánea de o-fenilfenol y bitertanol.
- Estudio de las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación simultánea de residuos de o-fenilfenol y bitertanol mediante acoplamiento LC-LC; optimización de las condiciones de acoplamiento y evaluación de las principales características analíticas del método desarrollado; validación del método mediante experiencias de recuperación en muestras de banana fortificadas a varios niveles de concentración.
- Aplicación del método LC-LC/FD desarrollado a muestras reales.
- Estudio de las condiciones de masas óptimas para la molécula de tridemorf mediante experiencias de infusión en interfase *electrospray* (ES); selección de ión precursor e iones producto.
- Estudio de las condiciones cromatográficas para la determinación de tridemorf mediante cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS).

- Ampliación del campo de aplicación del método LC-MS/MS, a otros fungicidas de interés: carbendazima, tiabendazol, imazalil, propiconazol y bitertanol.
- Estudio de las condiciones de masas óptimas para las moléculas de carbendazima, tiabendazol, imazalil, propiconazol y bitertanol mediante experiencias de infusión en interfase *electrospray* (ES); selección de iones precursores e iones producto; estudio de las condiciones cromatográficas para la determinación de estos fungicidas seleccionados y tridemorf mediante LC-MS/MS.
- Estudio de distintos disolventes para la etapa de extracción en la determinación de los fungicidas seleccionados mediante LC-MS/MS; evaluación del efecto matriz.
- Optimización y validación del método multiresiduo para la determinación de los fungicidas seleccionados en naranjas y bananas por LC-MS/MS.
- Aplicación del método LC-MS/MS desarrollado a muestras reales de naranja y banana; confirmación de los fungicidas detectados en las muestras.
- Estudio comparativo de los resultados obtenidos en muestras reales mediante los métodos analíticos desarrollados
- Estudio de las condiciones de masas óptimas para la molécula de paclobutrazol mediante experiencias de infusión en interfase *electrospray* (ES); selección de ión precursor e iones producto.
- Estudio de las condiciones cromatográficas para la determinación de paclobutrazol mediante cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas (LC-MS/MS).
- Optimización y validación del método LC-MS/MS desarrollado para la determinación de paclobutrazol en peras. Aplicación del método a muestras reales

El presente trabajo ha quedado reflejado en varios **artículos científicos**, publicados o enviados a publicar, en revistas de carácter internacional, incluidos en la parte experimental de esta Memoria:

- Direct Determination of Paclobutrazol Residues in Pear Samples by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry, (2003), J.V. Sancho, O. J. Pozo, T. Zamora, S. Grimalt, F. Hernández. J. Agric. Food Chem., 51, 4202.
- Determination of fungicide residues in fruits by coupled-column liquid chromatography, Journal of Separation Science (enviado: 14 de enero de 2004)
- Residue determination of tridemorph and other fungicides in fruit samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A (enviado: 14 de diciembre, 2003)
- Multiresidue method for the determination of fungicides in fruit samples by LC-FD and GC-MS (en preparación)

1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. INTRODUCCIÓN

La agricultura en Ecuador tiene un papel muy importante dentro de su economía, aportando en forma directa junto con la ganadería, alrededor de la quinta parte del PIB [1].

De todos los productos primarios que exporta Ecuador, la banana, también conocida como banano, constituye el segundo producto con mayor ingreso de divisas, después del petróleo, con equivalentes al 3% del PIB de la producción total y al 13% del PIB agrícola del país [2]. Así, dentro de la estructura de las exportaciones agropecuarias, el banano ha significado un motor importante de recursos, debido a que, de manera sostenida, año tras año viene aumentando sus ventas. Ello ha permitido al país que siga ocupando el primer lugar como exportador a nivel mundial desde 1952 y el tercero como productor mundial de esta fruta.

Las exportaciones de banano en el año 2002 representaron un volumen de 4,2 millones Tm, siendo los principales destinos, de acuerdo al volumen de exportación, la Unión Europea, Estados Unidos, Japón, Rusia y China. Por otra parte, cada eslabón de la cadena de operaciones que incluye el cultivo de banano constituye una fuente de empleo que integra al 16% de la población. Por todas estas razones, la actividad bananera tiene un peso importante dentro de la economía de Ecuador, si se considera además los efectos hacia otros sectores, ya que el 34% de los ingresos de este sub-sector son absorbidos por otros como el transporte, la industria de papel y cartón, construcción, caña guadua y el propio gobierno [3].

Ecuador presenta ventajas para la producción del banano, ya que posee factores climáticos que permiten la disponibilidad del producto durante toda la temporalidad anual y propician un crecimiento con buena calidad, siendo dos especies las más cultivadas: *Musa sapientum* y *Musa paradisiaca*. Sin embargo, estas mismas condiciones climáticas son las causantes de que la fruta esté expuesta a ciertas enfermedades de importancia ocasionadas por hongos, siendo este problema el que más atención conlleva para el sector productor. Antiguamente, el Mal de Panamá y, en la actualidad, la Sigatoka Negra, han

sido las principales enfermedades que acusa el banano, con cuya aparición se intensificó el uso de los fungicidas.

El Mal de Panamá, que es causado por un hongo conocido como *Fusarium oxysporum cubense*, se encuentra prácticamente erradicado en la actualidad, mientras que la Sigatoka del banano es una enfermedad que se encuentra diseminada en todas las regiones importantes del cultivo de banano en el mundo [4] (Figura 1.1). Se trata de manchas que aparecen en la superficie superior e inferior de la hoja, causadas por los hongos *Mycosphaerella musicola* (haz de la hoja) y *Mycosphaerella fijiensis* (envés de la hoja). El hongo *musicola* produce la Sigatoka Amarilla y la variedad *fijiensis* produce la Sigatoka Negra.

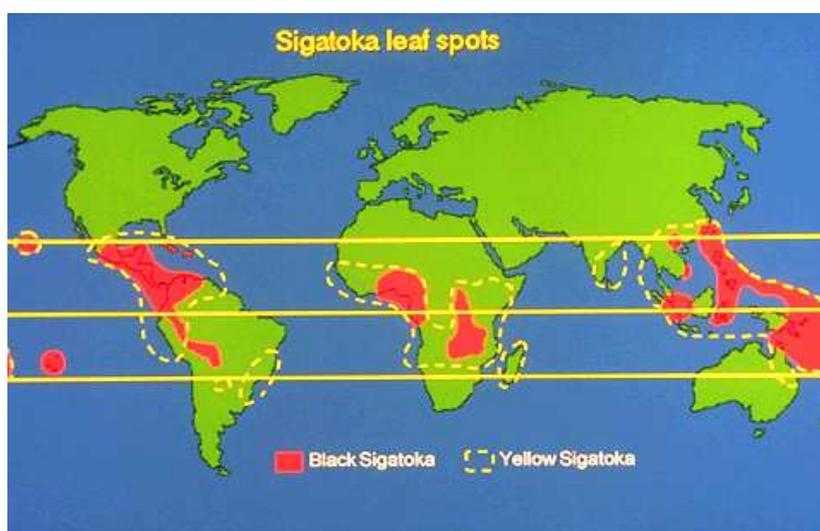


Figura 1.1. Distribución actual de la Sigatoka amarilla y negra. La expansión de la Sigatoka negra desplaza a la amarilla como la enfermedad más importante del banano.

En Ecuador se controla desde hace 30 años con gran eficacia la Sigatoka Amarilla mediante atomizaciones a bajo volumen con aceite agrícola, realizando aplicaciones únicamente cuando son necesarias. Por su parte, la Sigatoka Negra reviste mayor gravedad que la Amarilla, afectando a todas las variedades de banano y causando pérdidas de producción, en ciertos casos, de más del 50% [5]. Su control se realiza con fungicidas de tipo sistémico-penetrantes como benomilo, propiconazol, tridemorf y otros de tipo protector como clortalonil.

También se requiere la utilización de fungicidas post-cosecha, comúnmente tiabendazol e imazalil, para el control fúngico de la fruta durante su almacenamiento y transporte, especialmente en el caso de la fruta comercializada con fines de exportación.

En las plantaciones de banano, en donde han ido en aumento los problemas de resistencia a los fungicidas por parte del patógeno de la Sigatoka, ha sido necesario incrementar el número de aplicaciones (de 25 a 49). Actualmente, ya se está planteando también la ingeniería genética como alternativa de combate contra esta enfermedad [4].

En 1992 la aparición del denominado Síndrome de Taura, causante de la mortalidad masiva en los cultivos del camarón ecuatoriano, despertó gran atención nacional e internacional, desatando una intensa pugna entre dos importantes sectores de producción de la economía ecuatoriana, el camaronero y el bananero. Según estudios de laboratorio del sector camaronero, la presencia de los fungicidas Tilt® (propiconazol) y Calixin® (tridemorf) presentes en las piscinas de camarón fueron los causantes del síndrome [6].

El gobierno nacional, después de estudios contratados a la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos para determinar las causas del síndrome, concluyó que el problema también se encontraba en la contaminación y deterioro en el estuario del Río Guayas, donde se asientan las piscinas camaroneras. Posteriormente, se ha intentado probar que el síndrome tendría origen viral y no tóxico. Sin embargo, los estudios epidemiológicos realizados no han sido lo suficientemente contundentes para esclarecer toda esta controversia [7, 8].

Así pues, tridemorf y propiconazol son dos compuestos claramente implicados en esta problemática ambiental, pero a ello debemos sumar al bitertanol, clorotalonil y carbendazima (benomilo), entre otros, todos ellos plaguicidas que destacan también por su uso en el control de enfermedades fúngicas en el banano.

La práctica habitual del tratamiento de enfermedades con fungicidas en plantaciones bananeras se realiza mediante fumigaciones aéreas. En un informe publicado sobre la forma de trabajo en estas zonas de cultivo, *la Human Rights Watch* (HRW) [9] advierte de la toxicidad de los fungicidas a la que está expuesta

la población, sobre todo juvenil que trabaja en dichas plantaciones. El peligro que representan las fumigaciones aéreas involucra a todas las poblaciones que en general se asientan próximas a las zonas de cultivo tratadas, afectando especialmente a los hogares de los propios agricultores que suelen encontrarse dentro de la misma plantación. En algunos casos, se ha denunciado el nacimiento de niños con malformaciones como *paladar hendido*, debido a que sus madres cultivaron el campo durante el periodo de gestación, estando sometidas a los efectos nocivos de los fungicidas. Bien es cierto que el problema radica también en la falta de conocimiento por parte de los agricultores sobre la toxicidad de los fungicidas y en la falta de medidas de protección que deben emplearse para salvaguardar la salud de los trabajadores del campo.

Por otra parte, España es el sexto productor mundial de naranjas después de Brasil, Estados Unidos, México, India y China [10], representando los cítricos un área cultivable de 291.781 Ha en el territorio español, de las cuales 85.513 Ha corresponden a la Comunidad Valenciana.

Las exportaciones de cítricos en el año 2002 representaron el 62% del volumen de frutas, correspondiendo 1.572.022 Tm a naranjas, y siendo los principales destinos de exportación los países socios de la UE (principalmente Alemania, Francia y Holanda) con el 80%, y los países de Europa del Este con el 13% [10].

Las limitaciones más serias para la producción rentable de cítricos en todo el mundo son las enfermedades ocasionadas por bacterias, micoplasmas, hongos y virus. En concreto, la mayoría de los deterioros post-recolección de la fruta están inducidos por hongos que ocasionan imperfecciones en la fruta, la cual es sometida generalmente a un tratamiento fungistático con productos fitosanitarios como o-fenilfenolato sódico, tiabendazol y/o imazalil.

En la Tabla 1.1 se resumen algunas de las enfermedades ocasionadas por hongos en cítricos, así como su posible tratamiento mediante aplicación de fungicidas [11].

Tabla 1.1. Enfermedades ocasionadas por hongos en cítricos (naranjas y mandarinas)

<i>Enfermedad</i>	<i>Hongo</i>	<i>Tratamiento</i>
Tizón de las flores	<i>Colletrichum gloeosporioides</i>	Ciertos controles con benomilo y captafol, desarrollándose resistencias en algunos casos
Mancha de hollín	<i>Gloeodes pomigena</i>	Difícil eliminación por completo, pero pulverizaciones de aceite mata elimina crecimiento superficial.
Musgosa	<i>Capnodium citri</i>	
Mancha marrón	<i>Alternaria citri</i>	Control efectivo con captafol e iprodiona
Roña cítrica	<i>Elsinoe fawcettii</i>	Control efectivo con captafol, benomilo, tiofanato de metilo y ditianone
<i>Enfermedades durante el almacenamiento post-cosecha</i>		
Moho verde	<i>Penicillium digitatum</i>	Estos problemas pueden controlarse con una recolección adecuada, buenas medidas sanitarias y uso de fungicidas adecuados durante el almacenamiento de la fruta
Moho azul	<i>Penicillium italicum</i>	
Putrefacción amarga	<i>Endomyces geotrichum</i>	
Putrefacción marrón	<i>Phytophthora citrophthora</i>	

Es conocida la toxicidad de los plaguicidas en general, lo cual puede representar una seria amenaza a la salud de los seres humanos y al medio ambiente si su uso no se controla adecuadamente. Así, fungicidas como o-fenilfenol, bitertanol o benomilo, han sido clasificados por la EPA como posibles agentes carcinogénicos (grupo B2). El clorotalonil, por su parte, ha sido clasificado como altamente tóxico para la fauna acuática de acuerdo a los estudios de laboratorio de la EPA, aunque no presenta riesgos de toxicidad crónica debido a la rápida disipación en sistemas acuáticos.

Cabe resaltar que la mayoría de los países en vías de desarrollo carecen de legislaciones propias sobre aspectos relacionados con los plaguicidas. Así mismo, también existen plaguicidas prohibidos por algunos organismos y aceptados por otros, entre los cuales figuran algunos fungicidas, difiriendo los criterios de acuerdo a la zona. Es el caso, por ejemplo, de tridemorf, azoxystrobin, imazalil y bitertanol, los cuales pertenecen a la lista de plaguicidas ampliamente utilizados en países tropicales. Sin embargo, bitertanol e imazalil no están registrados para su uso en Canadá, de acuerdo con la *Health Canada's Pest Management Regulatory Agency*, a diferencia de Europa

en donde ambos compuestos son de uso permitido. Por su parte, el uso de tridemorf y azoxystrobin no está permitido en Inglaterra [12].

En la Tabla 1.2 se presentan los Límites de Máximos de Residuos (LMR) de algunos fungicidas pre y post-cosecha, frecuentemente utilizados en el cultivo de frutas y vegetales en general, y en bananas y naranjas en particular [13, 14].

Tabla 1.2. Límites Máximos de Residuos ($mg.Kg^{-1}$) de algunos fungicidas para bananas y naranjas.

<i>Fungicidas</i>	<i>España</i>		<i>EPA</i>	
	B	N	B	N
Bitertanol	0.05	0.05	-	-
Carbendazima	1	5	0.2 ⁽¹⁾ /1	-
Clorotalonil	0.2	0.01	0.05 ⁽¹⁾ /0.5	-
Dicloran	0.01	2	-	-
Imazalil	2	5	0.2 ⁽¹⁾ /3	-
Propiconazol	0.1	0.05	0.2	-
Tiabendazol	5	5	0.4 ⁽¹⁾ /3	-
Tridemorf	0.05	0.05	0.1	-
o-Fenilfenol	0.1	12	-	10

⁽¹⁾, residuos en pulpa

Los antecedentes descritos justifican la necesidad de desarrollar metodologías analíticas para la determinación de residuos de fungicidas en productos agroalimentarios como naranjas y bananas. Esto es muy importante en un país como Ecuador, donde las políticas de acción sobre la adecuada aplicación de plaguicidas en los diferentes cultivos y sobre el control de residuos de plaguicidas en productos agrarios no se encuentran suficientemente desarrolladas. No es el caso de España, que cuenta con una adecuada organización agraria acorde a políticas europeas actualmente encaminadas a una armonización, disponiendo, además, de un alto nivel en el desarrollo de la investigación científica con tecnología moderna, orientada al establecimiento de protocolos de análisis para la investigación de plaguicidas.

Así pues, resulta muy interesante para un país como Ecuador llevar a cabo este tipo de investigaciones de manera conjunta con grupos de investigación españoles, de modo que se desarrollen metodologías factibles de aplicación acorde

con el avance tecnológico disponible, dando lugar a la transferencia de conocimientos y tecnología a centros ecuatorianos de investigación.

Por tanto, la presente Tesis Doctoral se ha centrado en el desarrollo de métodos de análisis para la determinación de residuos de fungicidas en bananas y naranjas, principalmente. La selección de bananas (*Musa sapientum* y *Musa paradisiaca*) y naranjas (*Citrus sinensis*) se debe a los diferentes antecedentes mediambientales, sociales y de seguridad alimentaria anteriormente comentados, considerando el volumen de producción y consumo que generan estas frutas, así como la importancia económica que representan para los respectivos productores.

Referencias

- [1] *Cumbre mundial sobre la alimentación. Seguimiento del Plan de Acción en Ecuador*, disponible en www.rlc.fao.org/ong/eventos/2001/taller/TallerEcu.pdf, consultada el 2 de septiembre de 2003
- [2] Rizzo, P., *El banano ecuatoriano*, Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, disponible en: <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/Biblioteca/Ing%20Rizzo/banano/banano%20ecuatoriano.htm>, consultada el 16 de agosto de 2003.
- [3] Riofrio, M. (2003), *Trabajo de investigación macroeconómica: Efectos de la dolarización sobre la competitividad del Banano Ecuatoriano en el comercio internacional*, FLACSO, Ecuador
- [4] Ploetz, R. (1999), *La más importante enfermedad de la fruta más importante*, The American Phytopathological Society, disponible en www.iicasaninet.net/pub/sanveg/html/aps/banano/sigatokanegra.html, consultada el 7 de agosto de 2003.
- [5] Mourichon, X., Carlier, J., Fouré L. (1997), *Enfermedad de Sigatoka*, INIBAP, disponible en http://www.inibap.org/publications/factsheets/fiche8_spa.pdf, consultada el 16 de agosto de 2003.
- [6] *Diálogo sobre políticas de desarrollo disponible para el caso del síndrome de Taura*, (1994), Fundación Futuro Latinoamericano, disponible en www.fulano.org/sindrometaura.htm, consultada el 15 de agosto de 2003.

- [7] Molina, C., Enríquez, M., Panchana, F., Correa, L., Bolland, A., *Estudio de la etiología del Síndrome de Taura*, Centro Nacional de Acuicultura en Investigaciones Científicas Edgar Arellano, Ecuador, disponible en <http://www.cenaim.espol.edu.ec/publicaciones/cientif/revistas/200305003.pdf>, consultada el 16 de agosto de 2003.
- [8] *Síndrome de Taura*, Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), disponible en <http://www.oie.int/fdc/eng/Publicat/Cardsspanish/4%5B1%5D.1.1.TAU-E21REV.doc>, consultado el 17 de agosto de 2003.
- [9] *Child Labor and Obstacles to Organizing on Ecuador's Banana Plantations*, (2002), Human Rights Watch, disponible en www.hrw.org/reports/2002/ecuador/ecuad0402-04.htm, consultado el 12 de agosto de 2003.
- [10] Maluenda García, M. J. (2002), *El comercio Exterior Hortofrutícola en 2002*, disponible en http://www.infoagro.com/hortalizas/comercio_hortofruticola2002.htm consultada el 18 de agosto de 2003.
- [11] Davies, F.S., Albrigo, L.G. (1994), *Cítricos*, Editorial Acribia S.A., Zaragoza.
- [12] *Tridemorph banned in UK*, (2000), Pesticides news, No. 48, disponible en <http://www.pan-uk.org/pestnews/pn48/pn48p17a.htm> consultado el 5 de octubre de 2003.
- [13] *Límites máximos de residuos de productos fitosanitarios*, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaria General de Agricultura. Dirección General de Agricultura. Subdirección General de Medios de Producción Agrícolas, Edición 2.2, disponible en <http://www.mapya.es/productosfitos/pdf/LMRs/LMRS.pdf>, consultado el 17 de enero de 2004.
- [14] *Pesticides and food: what the pesticide residue limits are on food* (2003), U.S. EPA, disponible en <http://www.epa.gov/pesticides/food/viewtols.htm>, consultado el 17 enero de 2004.

1.2. USO DE FUNGICIDAS EN PRODUCTOS VEGETALES

Según la FAO, se estima que las pérdidas en la producción agrícola mundial causadas por diferentes plagas fluctúan entre un 20 y un 40%, variando su magnitud en función de la región, año y según el tipo de cultivo y de plaga como factor causal [1]. De esta manera, la lucha contra las plagas se ha centrado en la eliminación de los organismos que las causan, principalmente mediante productos químicos.

Los plaguicidas, en general, se utilizan sobre todo en los países industrializados (que consumen el 80% del total mundial), pero su uso se ha extendido rápidamente, con consecuencias en parte imprevisibles, a los países en vías de desarrollo [2]. Para hacernos una idea del consumo mundial de plaguicidas, una estadística reciente se refiere a un valor equivalente a 25100 millones de dólares durante el año 2002 [3].

El comercio mundial de plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas) en el año 2001 supuso un valor de 11000 millones de dólares, en donde los fungicidas ocuparon el segundo lugar de importancia, como puede apreciarse en la Figura 1.2, según las estadísticas de la FAO.

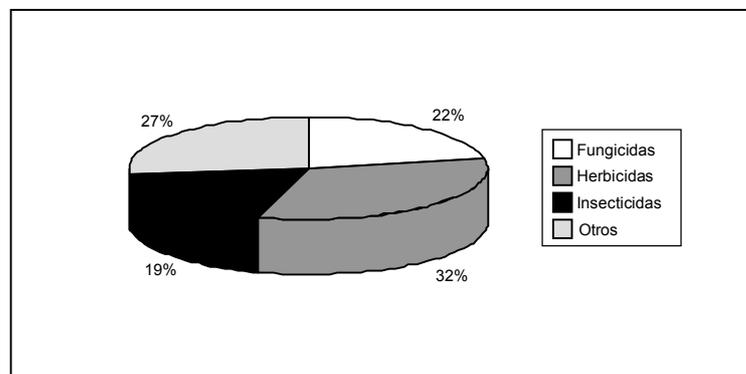


Figura 1.2. Consumo de plaguicidas por tipo de sustancias a nivel mundial en el 2001 (FAO)

A nivel español, de acuerdo con datos obtenidos de AEPLA, en el año 2002 se ha registrado un crecimiento en el consumo de fungicidas equivalente al 6.9% con respecto al año 2001. El consumo anual de plaguicidas superó en 2002 los 636 millones de euros, con una distribución por tipo de producto donde predominan los herbicidas seguido de los insecticidas y fungicidas, como se muestra en la Figura 1.4.

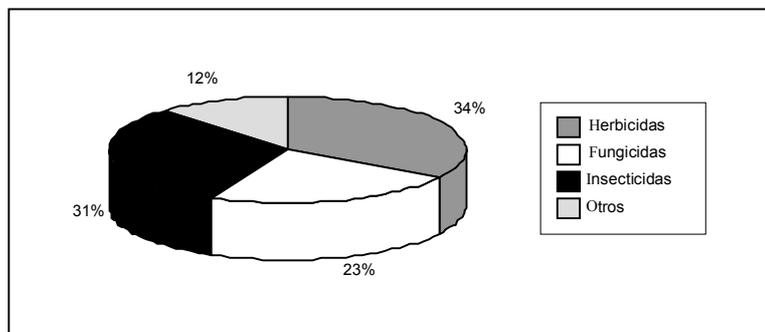


Figura 1.3. Porcentajes de tipo de plaguicidas utilizados en España en el año 2002

Cabe también destacar la distribución geográfica de agroquímicos en España, donde más de las 2/3 partes del consumo de plaguicidas se concentran en cuatro comunidades autónomas, Cataluña, Valencia, Murcia y Andalucía [4].

Por otra parte, el volumen de importación de fungicidas en Ecuador durante el año 2001 fue de 12898 Tm, según las estadísticas recopiladas por el Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador.

Los fungicidas constituyen una potencial fuente de contaminación, incluso en las aplicaciones más cuidadosas, debido a que estas sustancias van a dar al aire en forma de vapor, a las corrientes de aguas superficiales, o a los suelos, acabando por filtrarse en las aguas subterráneas.

Por otra parte, la potencia biocida de estas sustancias, es decir, su capacidad de eliminar los agentes nocivos, suele ser muy baja, ya que solo el 0.1%, aproximadamente, de la cantidad utilizada se aplica a su objetivo principal de eliminación de una especie nociva. Sin embargo, alcanza de forma

letal, directa o indirectamente, a toda la fauna [5]. Además, los fungicidas pueden tener efectos menos tóxicos, aunque devastadores, sobre el sistema inmunológico y endocrino de los seres vivos, incluyendo al hombre.

Estos riesgos para la salud humana debido al uso de pesticidas en general son mucho más elevados en los países en vías de desarrollo, donde constituyen un auténtico riesgo laboral, tanto para los agricultores como para sus familias debido a un menor grado de formación del agricultor y menor concienciación de sus riesgos tóxicos. Según los informes del Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), el envenenamiento por pesticidas afecta cada año a 25 millones de personas en los países en vías de desarrollo.

El continuo uso de productos fitosanitarios para combatir las numerosas plagas que atacan a los cultivos conlleva la presencia de residuos de plaguicidas en los alimentos, que en los últimos años se ha convertido en una constante preocupación para los consumidores puesto que incide directamente sobre la seguridad alimentaria. Así por ejemplo, una encuesta entre consumidores, efectuada en 1990 en el Reino Unido, mostró que el 80% de las personas entrevistadas estaban preocupadas por los niveles de plaguicidas y otras sustancias químicas [6].

Para evitar los efectos tóxicos de los plaguicidas es muy importante conocer los riesgos relacionados con su utilización y poder tomar las precauciones necesarias mediante el establecimiento de programas de prevención y protección adecuados.

1.2.1. Plaguicidas y Residuos de Plaguicidas

De acuerdo con el Codex Alimentarius (FAO/OMS), por plaguicida se entiende cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan un perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que puedan administrarse a los animales para combatir ectoparásitos. Este concepto engloba tanto a los

restos de molécula del plaguicida original como a los metabolitos con significación toxicológica.

La expresión de los residuos puede hacerse como residuos de la sustancia original, como residuo de un metabolito concreto, o bien como residuos de la sustancia original y metabolitos separadamente, cuyos resultados se expresan en miligramos de residuo por kilogramo de producto vegetal ($\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$).

Los plaguicidas constituyen un grupo de compuestos muy amplio y heterogéneo, por lo que existen diversas posibilidades de clasificación. Según el tipo de organismo que se pretende controlar se dividen en [7]:

- *Insecticidas*, que actúan contra insectos (pulgones, minadores, talabradores, chupadores, cochinillas, etc.).
- *Acaricidas*, que combaten araña roja, ácaros varios, etc.
- *Nematicidas*, usados contra nemátodos.
- Moluscocidas, destinados a exterminar caracoles y babosas.
- *Rodenticidas*, contra ratas, ratones y topillos.
- *Fungicidas*, que actúan contra hongos parásitos causantes de enfermedades en los cultivos.
- *Antibióticos*, de uso agrícola que luchan contra las bacteriosis propias de todos los cultivos.
- *Desinfectantes*, de suelos cuya acción más o menos general se extiende a nemátodos, insectos, hongos patógenos, malas hierbas, que se encuentran en los suelos destinados a los cultivos.
- *Herbicidas*, que actúan contra las malas hierbas, sea de un modo general o selectivo.

De acuerdo a su modo de acción los plaguicidas también pueden clasificarse en [8]:

- *Por contacto*, el producto actúa sobre el organismo o parásito al entrar en contacto con éste (insecticidas de origen vegetal: piretrina, rotenonas y nicotina; o, de origen mineral: aceites, polisulfuros, etc).
- *Por ingestión*, el plaguicida actúa al ser ingerido por el parásito (insecticidas arsenicales, lucrados, etc).

- *Por inhalación*, el producto actúa impidiendo la respiración del agente nocivo (insecticidas organofosforados, fungicidas ditiocarbámicos).
- *Mixtos*, el producto actúa por ingestión y por inhalación (insecticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides).
- *Repelentes*, por cuya actividad se alejan los insectos dañinos (insecticidas: naftalinas).
- *Atrayentes*, que por el contrario, los atraen hacia un cebo intoxicado (insecticidas: feromonas).
- *Adulticidas*, actúa sobre adultos (acaricidas).
- *Larvicidas*, actúa sobre larvas (acaricidas).
- *Ovicidas o Esterilizantes*, que por sistema parecido provocan la infertilidad de huevos y puestas en los insectos, o inhiben completamente el mecanismo sexual (acaricidas).
- *Preventivos*, se aplican antes de que se haya producido la infección, para impedir la germinación de la espora del hongo (captafol, captan, tiram, etc.).
- *Penetrantes*, actúan contra hongos de penetración incipiente o superficial (bitertanol, folpet, ditianona).
- *Curativos o Sistémicos*, Se aplican con la planta ya infectada, penetrando en el interior de ésta e impidiendo el desarrollo del hongo (tiabendazol, benomilo, carbendazima).

Finalmente, los plaguicidas pueden ser clasificados atendiendo a sus efectos tóxicos. La Reglamentación Técnico-Sanitaria española para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas (Real Decreto 3349/30 noviembre de 1983, modificado por el Real Decreto 443/1994) clasifica los plaguicidas en tres categorías atendiendo a la toxicidad aguda, expresada en DL50 (dosis letal media) o en CL50 (concentración letal media) (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad

	Muy Tóxico	Tóxico	Nocivo
DL50 oral (mg·Kg ⁻¹ de peso corporal)	≤25	>25 - ≤200	>200 - ≤2000
DL50 dérmica (mg·Kg ⁻¹ de peso corporal)	≤50	>50 - ≤400	>400 - ≤4000
CL50 por inhalación (mg·L ⁻¹ de aire)	≤0.5	>0.5 - ≤2	>2 - ≤20

1.2.2. Toxicidad de los Plaguicidas

La significación toxicológica de los diversos tipos de residuos es distinta. En cuanto a los residuos extraíbles es evidente que las formas libres ofrecen un riesgo derivado de su toxicidad directa. Por lo que respecta a los residuos conjugados, aunque las conjugaciones normalmente son procesos de destoxicación, como son biodisponibles, pueden también ofrecer riesgos.

La toxicidad de los pesticidas en general, y esto incluye a los fungicidas, presenta distintos aspectos según su distinta trascendencia. Por lo que a sus efectos más inmediatos se refiere, se consideran varias clases de toxicidad [6]:

- *Toxicidad oral* aguda. Se refiere a la ingestión de una sola vez de un producto pesticida tóxico. Se expresa en términos de *dosis letal media*, abreviadamente DL50, que significa la cantidad de tóxico que es necesario ingerir de una sola vez para producir la muerte del 50% de los animales en ensayo. Esta dosis se expresa, normalmente, en miligramos por kilogramo de peso del animal ensayado. La DL50 oral aguda da una idea de la toxicidad relativa de los pesticidas y, extrapolando más o menos razonablemente estos resultados, puede deducirse una DL50 teórica para los seres humanos, aunque la extrapolación es puramente orientativa pues, varía de una especie a otra.
- *Toxicidad dérmica*. Se refiere a los riesgos tóxicos debidos al contacto y absorción del pesticida por la piel. Al igual que la anterior se expresa en términos de DL50 y en miligramos/kilogramo peso. Estos ensayos se efectúan por aplicación del producto sobre la piel afeitada del animal ensayado.
- *Toxicidad crónica*. Mediante dietas alimentarias preparadas con dosis variadas del tóxico que se estudia, se averiguan los niveles de riesgo del

pesticida a través de su administración diaria a los animales en ensayo durante periodos largo de tiempo (hasta de 2 años), aunque también se hacen a corto plazo (menos de 6 meses), pero en este caso se les prefiere denominar *toxicidad sub-aguda* o *sub-crónica*. Se expresan como partes por millón de tóxico presente en la dieta alimenticia durante los días que se especifiquen y que produce los efectos que se señalen.

- *Toxicidad sub-aguda* o *sub-crónica*. Aquí el efecto que se toma en consideración no es la muerte del animal. Puesto que las dosis administradas son más bajas que en la exposición aguda, los efectos también son menos externos y se registran todas las alteraciones producidas en todos los tejidos y fluidos corporales. Este tipo de experimentación permite obtener el llamado nivel sin efecto adverso observable (NOEL), la dosis máxima a la que ninguno de los animales muestra efectos tóxicos, que es una medida cuantitativa de la toxicidad de un compuesto, y también presenta una amplia variabilidad con respecto a la especie ensayada. Teóricamente, el NOEL hallado experimentalmente en animales permite obtener la estimación de los niveles a los que el agente ensayado será tóxico para el hombre.

Aparte de la toxicidad, hay que tener en cuenta otros riesgos como son las reacciones inesperadas de hipersensibilidad o alergia. También en caso de manejo negligente o uso impropio son frecuentes los síntomas de intoxicaciones por inhalación o por penetración en la piel, boca y ojos. Así mismo, también hay estudios que relacionan a los plaguicidas con la neurotoxicidad, mutagénesis, carcinogénia y reproducción.

La OMS considera que, mientras que los efectos de la toxicidad aguda son fácilmente reconocidos, los efectos que resultan de la exposición a largo plazo a bajas dosis son, a menudo, difíciles de distinguir. En particular, los efectos de una ingestión regular de residuos de plaguicidas en alimentos son difíciles de detectar y cuantificar.

1.2.3. Residuos de Plaguicidas en Alimentos

El grado de exposición del ser humano a los residuos en alimentos depende de los tratamientos que efectúen los agricultores en campo y en post-

recolección y del tiempo transcurrido desde la aplicación hasta el momento del consumo, así como de la composición de la dieta alimentaria media en una zona geográfica considerada.

Inmediatamente después del tratamiento con un plaguicida, queda sobre el vegetal una cantidad determinada del mismo, la que se denomina depósito de plaguicida. Esta cantidad puede ser variable en función de factores como: dosis de plaguicida aplicado, naturaleza química del plaguicida, naturaleza de la formulación, características de la aplicación, morfología y naturaleza de la superficie vegetal y condiciones climáticas.

La cantidad de residuo presente en el momento del consumo del producto tratado depende del depósito inicial y del tiempo transcurrido entre el tratamiento y la recolección o consumo, teniendo en cuenta la acción de los factores que influyen en su disipación y de los tratamientos domésticos e industriales a los que se somete el producto después de su recolección.

Así, a lo largo del tiempo, los residuos van disminuyendo progresivamente por la acción de diversas causas:

- Crecimiento del órgano vegetal tratado, produciéndose una eliminación aparente del residuo.
- Causas mecánicas, como la lluvia o el viento, que pueden producir el arrastre del plaguicida.
- Causas físicas, como la volatilización, solubilización.
- Degradación química, considerada como la vía central de disipación de los plaguicidas. La degradación química puede deberse a fenómenos químicos o bioquímicos, en la superficie o en el interior del tejido vegetal. Hay que tener en cuenta que, como producto de esta degradación, puede surgir un metabolito inocuo o de toxicidad significativa, superior en ocasiones a la materia activa.

La representación gráfica de la evolución de la cantidad de residuos sobre un producto vegetal a lo largo del tiempo, en función de los diversos factores, es lo que se conoce como curva de disipación. A partir de estas curvas se puede determinar el tiempo necesario para que el residuo de plaguicida alcance un determinado valor (plazo de seguridad) o tiempo de espera a transcurrir entre el

tratamiento y la recolección [6]. En algunos casos, al cabo de cierto tiempo, se disipan totalmente los residuos, hasta el punto de quedar en cantidades inferiores al límite de determinación analítica, pero en otros casos, como sucede con los compuestos lipófilos en frutos cítricos, van a persistir residuos en el fruto aunque sea en pequeñas concentraciones [3].

Residuos por Tratamientos Post-cosecha

La problemática por residuos de plaguicidas en alimentos vegetales como consecuencia de aplicaciones en post-recolección es de especial atención, debido a que el momento de su aplicación es más próximo a su consumo que en el caso de los tratamientos de pre-cosecha y porque en su disipación no intervienen (o intervienen menos) los agentes meteorológicos y otros tipos de factores, haciendo que la disipación de los residuos en estos casos sea mucho más lenta que en los tratamientos de campo.

Lo cierto es que, después de la aplicación de un producto fitosanitario de post-cosecha sobre una partida de frutas, la cantidad de residuos que éstas presentan va a depender de varios factores, entre los que cabe destacar: el tipo de fungicida, la dosis de aplicación, características de la aplicación, tipo de vegetal sobre el que se aplican, características del almacenamiento y tiempo transcurrido desde que se ha efectuado la aplicación hasta que se comercializa y consume el fruto [6].

Otro aspecto interesante es la distribución del residuo en el fruto. En el caso de frutos cítricos, la mayor parte de los residuos se localizan en la piel, pasando muy poco a la pulpa. De acuerdo con Coscollá [6], esto ha sido estudiado por diversos autores mediante una serie de ensayos en cítricos, para compuestos como o-fenilfenol, sec-butilamina, benomilo, imazalil, tiabendazol, etc., por mencionar algunos ejemplos. Así también se menciona el caso de fosetil-Al, fungicida sistémico, el cual puede encontrarse en cantidades apreciables en la pulpa, pero siempre menos de la mitad que en la corteza.

1.2.4. Normativa Legal sobre Residuos de Plaguicidas

Debido a los aspectos tóxicos que puede conllevar la presencia de residuos de plaguicidas en los alimentos y con el fin de proteger la salud de los consumidores, las Administraciones de un gran número de países han dictado una serie de normas legales referentes a los residuos de plaguicidas. Estas normas van desde ciertas obligaciones formales de homologación y registro, incluyendo la fijación de límites máximos de residuos (LMR), hasta la prohibición del uso de ciertos plaguicidas.

Para conocer el grado de exposición del hombre a los residuos es necesario estudiar sus costumbres alimentarias y la composición de la dieta media de la zona considerada, a fin de estimar la ingestión diaria media de los distintos plaguicidas por parte de la población.

Sin embargo, y especialmente teniendo en cuenta los importantes factores de seguridad que se aplican para la fijación de los LMR, se considera que la salud de los consumidores se encuentra razonablemente protegida, aunque no se den las garantías absolutas, ya que la determinación de los LMR están sujetos a ciertas críticas en relación a aspectos toxicológicos de los compuestos. Desde el punto de vista agronómico nos encontramos que distintos países pueden tener distintos criterios sobre las *buenas prácticas agrícolas*, lo que conduce a diferencias notables en los LMR para un mismo plaguicida en el mismo producto vegetal. Esto crea un serio problema para el comercio internacional (e incluso dentro de la Unión Europea), y también para el productor, el cual desconoce normalmente el destino de su fruta u hortaliza en el momento del tratamiento de su cultivo.

Conscientes de este problema, los organismos comunitarios han promulgado una serie de Directivas tratando de armonizar los LMR, incluyendo dos líneas de acción: la fijación de los LMR comunitarios para cada plaguicida, y el establecimiento de un sistema de vigilancia de los contenidos de residuos de plaguicidas en los productos vegetales que se pongan en circulación en el mercado comunitario. Ello conlleva que cada país miembro se responsabilice de ejecutar programas de inspección, para impedir que se pongan en circulación en su territorio aquellos productos vegetales con residuos de plaguicidas que excedan los contenidos máximos fijados [9].

Las primeras Directivas europeas sobre este tema son antiguas (76/895 y modificaciones hasta la 89/186), llegándose al mercado único ya en los años noventa, momento hasta el cual solo se habían armonizado los LMR de 64 plaguicidas (actualmente tenemos en mercado más de 500 a nivel español y 900 a nivel europeo). Por ello se han publicado las Directivas marco 90/642 (frutas y hortalizas), 86/362 (cereales), 86/363 (productos de origen animal) y 97/41, por las cuales se establece un régimen común que fija contenidos máximos obligatorios de residuos aplicables a toda la Comunidad Europea. Estas Directivas, junto con la del Registro Único Europeo (Directiva 91/414), constituyen el marco para la fijación de LMR europeos. Como consecuencia de ellas, se están publicando una serie de Directivas fijando LMR, pero el problema es que su implementación es lenta. Así, hasta ahora solo se han armonizado los LMR de 198 plaguicidas estando prevista la modificación a fondo de la legislación comunitaria sobre residuos de plaguicidas en base a la promulgación de un Reglamento, lo que no exigiría transposición a las legislaciones nacionales, por lo que se aplicaría simultáneamente en todos los países miembros [3].

En la actualidad, los LMR para España se rigen de acuerdo a la aplicación del Real Decreto 280/1994 por el que se establecen los límites máximos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal, incluyéndose en el Anexo II los valores de LMR para cada plaguicida, modificado por última vez el 19 de junio de 2003 por la Orden 1672/2003.

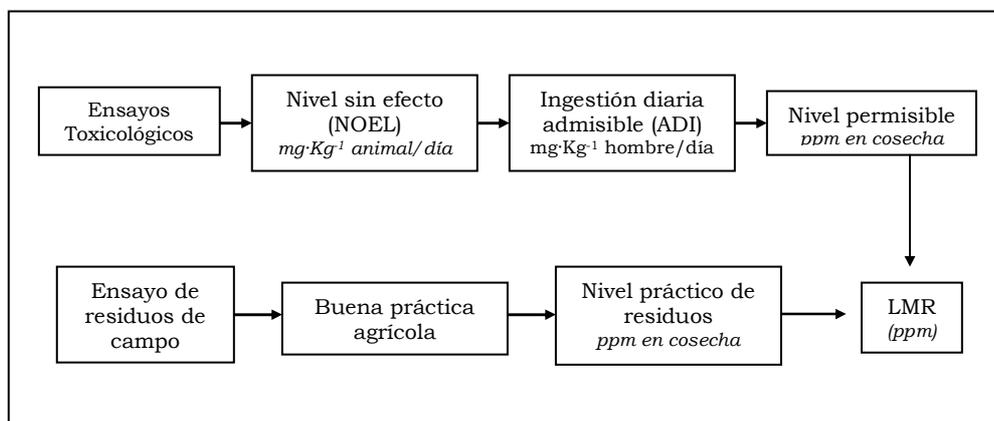
A nivel internacional, la FAO y la OMS, crearon en 1966 el Comité del Codex sobre Residuos de Plaguicidas (CCPR), cuyo primer objetivo fue establecer unas recomendaciones sobre los LMR, a la vez que regular los métodos de muestreo, análisis y ensayo. Sin embargo, no existe la obligación de incorporar dichos LMR a las distintas legislaciones; en todo caso, deben ser respetados en países poco desarrollados, donde no existe normativa legal al respecto [6].

Límite Máximo de Residuos

El límite máximo de residuo es la cantidad máxima de residuo de un determinado plaguicida sobre un determinado producto agrícola permitida por la Ley, que puede aceptarse para el consumo humano o animal a largo plazo [6].

Para la determinación de los LMR, aunque hay diferentes procedimientos, se consideran dos criterios básicos: uno toxicológico y otro agronómico, los cuales se presentan de forma resumida en la Figura 1.4.

Figura 1.4. Esquema de fijación de los LMR



El criterio toxicológico pretende que la ingestión diaria del plaguicida, a lo largo de toda una vida, no provoque efectos adversos a la salud de los consumidores. La ingestión diaria aceptable (ADI) de una sustancia química es la expresión de la cantidad de residuos que se pueden ingerir directamente en un periodo largo y se suele establecer basándose en datos obtenidos en estudios de alimentación sobre animales durante periodos prolongados. Para ello, se determina, en primer lugar, el valor NOEL, el cual es obtenido en animales y es extrapolable al hombre, obteniendo después el valor ADI mediante corrección con un factor de seguridad, generalmente de 100. Este factor de seguridad tiene en cuenta la diferencia entre los animales y el hombre y la diversidad entre individuos de la misma especie, como son las diferencias en su estado de salud, nutrición, edad, etc. Se expresa en miligramos de sustancia química por kilogramo de peso corporal, y a partir de ella se calcula el nivel permisible de residuos para el hombre en alimentos. En este cálculo se debe tener en cuenta el peso promedio del hombre, establecido en 60 Kg, y el factor alimentario, que representa el valor promedio per cápita del consumo de alimentos, o bien el conjunto de alimentos que puede contener el plaguicida objeto de estudio que es de 0.4 para el conjunto de productos vegetales.

En consecuencia, la fórmula general para calcular el nivel permisible de residuos de un plaguicida en un producto vegetal, expresado en miligramos de plaguicida por kilogramo de alimento o ppm, desde el punto de vista toxicológico, será:

$$\text{Nivel permisible} = \frac{\text{NOEL} \times \text{peso promedio humano (60)}}{\text{factor de seguridad (100)} \times \text{factor alimentario}}$$

De acuerdo con el criterio agronómico, se efectúan ensayos de campo con el fin de conocer el residuo real del plaguicida objeto de estudio que queda sobre los alimentos, cuando son tratados de acuerdo a buenas prácticas agrícolas.

En definitiva, los LMR se fijan teniendo en cuenta los residuos que quedan en la cosecha, siempre que no se supere el ADI. Los criterios sobre la buena práctica agrícola pueden ser muy variables de un país a otro, debido a diferencias en los tipos y gravedad de plagas, formas de cultivo, variedades empleadas, condiciones climáticas, etc. Por otra parte, las cifras que los expresan están en continuos cambios, ya que hay constantemente nuevas aportaciones científicas, aparecen nuevas plagas y disminuye la gravedad de otras, se amplían las autorizaciones de uso de unos plaguicidas, se reducen las de otros, algunos se retiran, aparecen plaguicidas nuevos, etc.

1.2.5. Fungicidas

Los fungicidas son sustancias que actúan sobre los hongos patógenos causantes de las enfermedades criptogámicas. En la mayor parte de los casos, la acción de los fungicidas es principalmente preventiva, siendo efectivos cuando la infección comienza. Los fungicidas preventivos actúan a modo de contacto (*no sistémicos*), mientras que los fungicidas *sistémicos*, de aparición más reciente, son absorbidos por la planta y transpuestos en el interior de la misma. Hay que distinguir además a los fungicidas que matan al hongo erradicándolo y los productos fungistáticos que detienen su desarrollo.

Los fungicidas pueden agruparse en dos grandes grupos: *inorgánicos* y *orgánicos*, siendo estos últimos los más importantes por su mayor demanda en

la actualidad. Se puede establecer una clasificación en función de su composición química [10]:

- Alquilenbis(ditiocarbamato)s:
Mancozeb, maneb, nabam, propineb, zineb
- Anilinopirimidinas:
Cyprodinil, mepanipyrim, pyrimethanil
- Antibióticos:
Blasticidin-S, Kasugamycin, Validamycin A
- Derivados hidrocarburos aromáticos:
Byphenil, hexachlorobenzene, 2-phenylphenol, quitozene
- Azoles y análogos:
Azoconazole, bitertanol, bromuconazole, cyproconazole, difenoconazole, fenbuconazole, fluquinconazole, flusilazole, flutriafol, hexaconazole, imazalil, imibenconazole, myclobutanil, pefurazoate, penconazole, prochloraz, propiconazole, tebuconazole, tetraconazole, triadimefon, triadimenol, triflumizole, triforine
- Benzimidazol:
Benomyl, carbendazim, fuberidazole, thiabendazole, thiophanate methyl
- Carboxamidas:
Carboxin, flutolanil, mepronil
- Dicarboxamidas:
Chlozolate, iprodione, procymidone, vinclozolin
- Dimetilditiocarbamatos:
Ferbam, thiram, ziram
- Dinitrofenoles:
Dinobuton, dinocap
- Guanidinas:
Dodine, guazatine, iminoctadine
- Metil isocianato y precursores:
Dazomet, metam, methyl isothiocyanate
- Morfolinas:
Dimethomorph, fenpropidin, tridemorph
- Fungicidas organofosforados:
Edifenphos, fosetyl-aluminium, irpobenfos, phosdiphen, pyrazophos, tolclofos-methyl

- Fenoxiquinolinas:
Quinoxifen
- Fenilamidas:
Benalaxyl, furalaxyl, metalaxyl
- Fenil carbamatos:
Diethofencarb
- Fenilpirroles:
Fenpiclonil, fludioxonil
- Pirimidinas:
Bupirimate, dimethirimol, ethirimol
- Pirimidinil carbinoles:
Fenarimol, nuarimol
- Análogos de la Estrobilurina:
Azoxystrobin, kresoxim-methyl
- Derivados de N-trihalometiltio:
Captafol, captan, dichlofluanid, folpet, tolyfluanid
- Otros fungicidas:
Chinomethionat, chlorothalonil, cymoxanilm dichlorophen, dicloran, diphenylamine, etridiazole, famoxadone, fentin, fluazinam, fluoroimide, 8-hydroxyquinoline sulfate, hymexazol, isoprothiolane, pencycuron, pyroquilon, triazoxide

De acuerdo con Cremlyn [11], para que un producto químico se considere como posible fungicida protector eficaz deberá satisfacer ciertas condiciones:

- Baja fitotoxicidad, de lo contrario causará graves daños a la planta huésped durante su aplicación.
- Ser fungitóxico y de acción rápida, antes de que la infección penetre la cutícula vegetal.
- Capacidad de adhesión a las plantas, considerando que los fungicidas de protección agrícola se aplican por medio de rociados foliares y deben resistir a los efectos climatológicos.

1.2.6. Selección de Fungicidas a Estudiar

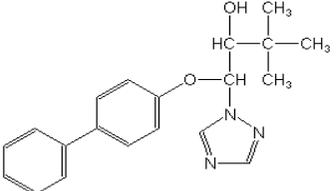
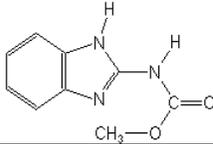
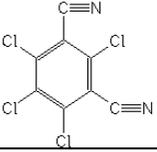
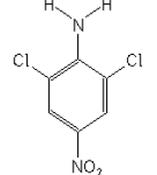
Dada la importancia que reviste el uso de fungicidas, particularmente para el control de enfermedades de campo y para el tratamiento post-cosecha de cítricos y de banano, dos productos relevantes para la economía de España y Ecuador, se han seleccionado aquellos de uso más frecuente, con el fin de acometer su estudio analítico:

- Benzimidazoles: *carbendazima*, *tiabendazol*, *benomilo* y *tiofanato de metilo*
- Azoles y similares: *bitertanol*, *imazalil*, *propiconazol* y *paclobutrazol*
- Morfolinas: *tridemorf*
- Derivados aromáticos: *o-fenilfenol*
- Otros: *clorotalonil* y *dicloran*

Se ha incluido el estudio de *paclobutrazol*, compuesto que presenta características fungicidas, aunque es más utilizado como regulador del crecimiento en frutas de hueso como peras.

En la Tabla 1.4, se recogen algunos datos de interés [12] sobre los fungicidas seleccionados:

Tabla 1.4. Características de los fungicidas seleccionados

Compuesto	Estructura química	Peso molecular (g)	Solubilidad en agua (mg·L ⁻¹)	NOEL* (mg·Kg ⁻¹)	ADI** (mg·Kg ⁻¹)	Toxicidad: LD ₅₀ (mg·Kg ⁻¹); LC ₅₀ (mg·L ⁻¹)
Bitertanol β-([1,1'-biphenyl]-4-yloxy)-α-(1,1-dimethylethyl)-1H-1,2,4-triazole-1-ethanol		337.4	2.7 (a) 1.1 (b)	100	0.01	LD ₅₀ : > 5000 LC ₅₀ : 2.2 - 2.7
Carbendazima Methyl 1H-benzimidazol-2-ylcarbamate		191.2	29 (pH 4) 8 (pH 7)	300 (e)	0.03	LD ₅₀ : > 15000 LC ₅₀ : 0.61 - > 17.25
Clorotalonil 2,4,5,6-tetrachloro-1,3-benzenedicarbonitrile		265.9	0.81	1.8	0.03	LD ₅₀ : > 10000 LC ₅₀ : 44000-62000
Dicloran 2,6-dichloro-4-nitrobenzeneamine		207.0	6.3	1000	0.03	LD ₅₀ : 4040 LC ₅₀ : 32 - 1.6

(*) IDA: ingestión diaria aceptable, (**) NOEL: nivel sin efecto observable

(a) (b) diastereoisómeros, (c) ensayos en perros, (d) ensayos en Daphnia, (e) g·L⁻¹.

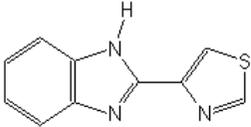
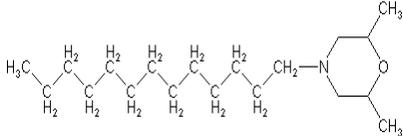
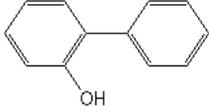
Tabla 1.4. Características de los fungicidas seleccionados

Compuesto	Estructura química	Peso molecular (g)	Solubilidad en agua (mg·L ⁻¹)	NOEL (mg·Kg ⁻¹)	ADI (mg·Kg ⁻¹)	Toxicidad: LD ₅₀ (mg·Kg ⁻¹); LC ₅₀ (mg·L ⁻¹)
Imazalil (±)-1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(2-propenyloxy)ethyl]-1H-imidazole		297.2	180	2.5	0.03	LD ₅₀ : 227-343 LC ₅₀ : 4.04 – 1.5
Paclobutrazol (R,R)-(±)-β-[(4-chlorophenylmethyl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)]pentan-3-ol		293.8	26	250	0.1	LD ₅₀ : 2000 - 1300 LC ₅₀ : 27.8
Propiconazole 1-[[2-(2,4-dichlorophenyl)-4-propyl-1,3-dioxolan-2-ylmethyl]-1H-1,2,4-triazole		342.2	100	3.6	0.02	LD ₅₀ : 1517 LC ₅₀ : 6.8 – 2.6

(^a) IDA: ingestión diaria aceptable, (^{**}) NOEL: nivel sin efecto observable

(^a) (^b) diastereoisómeros, (^c) ensayos en perros, (^d) ensayos en *Daphnia*, (^e) g·L⁻¹.

Tabla 1.4. Características de los fungicidas seleccionados

Compuesto	Estructura química	Peso molecular (g)	Solubilidad en agua (mg·L ⁻¹)	NOEL (mg·Kg ⁻¹)	ADI (mg·Kg ⁻¹)	Toxicidad: LD ₅₀ (mg·Kg ⁻¹); LC ₅₀ (mg·L ⁻¹)
Tiabendazole 2-(4-thiazolyl)-1H-benzimidazole		201.2	10 (pH 2) < 0.05 (pH 5-12) ^(e)	40	0.1	LD ₅₀ : 3100 LC ₅₀ : 0.45 ^(d)
Tridemorf 2,6-dimethyl-4-tridecylmorpholine		297.5	1.1	30	0.016	LD ₅₀ : 480 LC ₅₀ : 3.4
o-Fenilfenol [1.1'-biphenyl]-2-ol		170.2	700	2	0.02	LD ₅₀ : 2700 LC ₅₀ : tóxico

^(*) IDA: ingestión diaria aceptable, ^(**) NOEL: nivel sin efecto observable

^(a) ^(b) diastereoisómeros, ^(c) ensayos en perros, ^(d) ensayos en *Daphnia*, ^(e) g·L⁻¹.

Fungicidas Bencimidazólicos

Los bencimidazoles son los fungicidas de tipo sistémico más conocidos, siendo efectivos contra un amplio número de enfermedades causadas por ascomicetos y basidiomicetos. Por lo que respecta a su constitución química, pueden distinguirse dos grupos de derivados benzimidazólicos, claramente diferenciados: a) derivados tipo benomilo, al que pertenece la carbendazima, y b) derivados tipo tiabendazol.

La **carbendazima** es el metabolito de transformación del benomilo y de otros fungicidas como el tiofanato de metilo, también incluido en el grupo de derivados del tipo benomilo. Generalmente, la carbendazima es el principal residuo presente en plantas como producto de la aplicación de cualquiera de los fungicidas antes mencionados. De este modo, se considera que la actividad fungicida de estos compuestos se debe a la estructura química de la carbendazima.

La carbendazima como tal posee acción protectora y curativa, siendo absorbida a través de la raíz hasta el resto de la planta. Su uso radica en el control de una serie de enfermedades fúngicas presentes en cereales, remolacha azucarera, uvas, tomates, manzanas y frutas en general, así como en el tratamiento de semillas y en el cultivo del algodón. Cabe indicar que este compuesto puede permanecer estable en condiciones ácidas, pero se descompone lentamente a 2-aminobencimidazol bajo condiciones básicas.

Por su parte, el uso de **tiabendazol** se expandió rápidamente en el tratamiento de post-cosecha de cítricos, manzanas, peras y bananas, debido a la eficacia para combatir el *Penicillium* a bajas dosis. El tiabendazol también es empleado en el tratamiento de semillas y de suelo, aparte de una serie de aplicaciones foliares, sólo o combinado con otros fungicidas.

Los fungicidas bencimidazólicos han sido ampliamente utilizados, pero la aparición de resistencias por parte de muchos patógenos ha provocado que actualmente se usen combinados o en alternancia con otros productos de acción multipuntual. El modo de acción de estos compuestos se debe a la disrupción de los microtúbulos del citoplasma causando desórdenes en la estructura celular del patógeno y, en definitiva, ocasionando la inhibición de la mitosis. La selectividad con la que actúan estos compuestos se atribuye a la

unión específica entre el bencimidazol (Figura 1.5) y las tubulinas de los microtúbulos celulares del hongo, de manera que la ausencia de esta afinidad es la responsable de la baja toxicidad de los bencimidazoles en plantas y animales, en los cuales suelen ser utilizados como antihelmínticos.

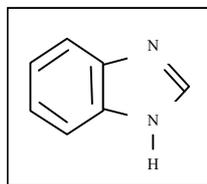


Figura 1.5. Anillo del bencimidazol

El metabolismo de los bencimidazoles en plantas puede ser el resultado de la hidrólisis o fotólisis en la superficie foliar, con apertura del anillo bencimidazólico. La degradación en suelos y aguas naturales se ve favorecida por la presencia microbiana del medio. En general, estos compuestos presentan una limitada solubilidad en agua a pH fisiológico, pero son muy solubles en condiciones fuertemente ácidas.

Fungicidas Azólicos

Los derivados azólicos representan una importante clase de fungicidas sistémicos, aunque algunos de ellos no lo sean realmente, pero forman parte de este grupo debido a su estructura química, como es el caso del bitertanol. La ventaja de estos fungicidas sistémicos radica en su capacidad de penetrar a la planta y desplazarse desde el sitio de aplicación, distribuyéndose por toda la planta.

Los compuestos azólicos utilizados en la agricultura poseen estructuras diversas en las cuales la presencia de un anillo 1,2,4-triazol (Figura 1.6a) o imidazol (Figura 1.6b) son la característica común. Los imidazoles y los triazoles se consideran juntos porque comparten el mismo espectro antimicótico y el mismo mecanismo de acción, aunque los triazoles sistémicos se metabolizan más lentamente y tienen menores efectos sobre la síntesis de esteroides endógenos que los imidazoles.

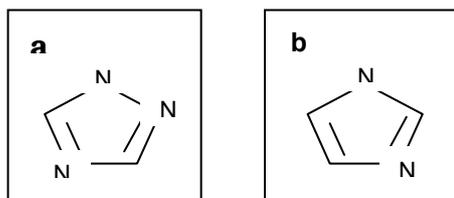


Figura 1.6. (a) anillo de 1,2,4-triazol, (b) anillo de imidazol

Estos compuestos son, en general, estables a la temperatura y a fenómenos de hidrólisis. Además son escasamente solubles en agua y más bien solubles en disolventes orgánicos. Los compuestos ionizables pueden poseer propiedades débilmente básicas. Un considerable número de compuestos azólicos poseen estereoisomerías, dando como resultado mezclas de estereoisómeros como es el caso del bitertanol. Por su parte, el propiconazol tiene dos centros quirales situados en las posiciones 2 y 4 del anillo central de dioxolano y, por lo tanto, puede existir como cuatro estereoisómeros. Cromatográficamente el par enantiómero co-eluye; sin embargo, los estereoisómeros (*cis* y *trans*) pueden ser separados fácilmente, produciendo espectros totalmente idénticos mediante detección por espectrometría de masas.

El mecanismo de acción de los fungicidas azólicos radica en su capacidad de interferir en la inhibición de la biosíntesis del ergosterol. Este esteroide es esencial para la estructura de la membrana y para la función de la pared celular de muchos hongos, de modo que el bloqueo de la síntesis del ergosterol produce la muerte de la célula o por lo menos una fuerte inhibición en el crecimiento del hongo.

Estos fungicidas son utilizados como aereosoles foliares y en el tratamiento de semillas. Se conoce que la mayoría de los azoles poseen una baja toxicidad sobre mamíferos, y su degradación en el suelo puede ser bastante lenta con largos periodos de vida.

Bitertanol y **propiconazol** son ampliamente utilizados como fungicidas de acción curativa y protectora en el cultivo de plantas ornamentales, frutas y vegetales en general. El propiconazol ha sido empleado también para el control de enfermedades en cereales y es particularmente activo contra enfermedades fúngicas cuyo patógeno ha desarrollado resistencia a los fungicidas

bencimidazólicos. El **imazalil**, como fungicida sistémico de acción protectora y curativa también, es utilizado para el control de un amplio número de enfermedades fúngicas en frutas, vegetales y plantas ornamentales, así como contra el moho en rosas y como fungicida post-cosecha durante el almacenamiento de frutas cítricas, manzanas, bananas y semilla de patatas y en la preparación de semillas.

El metabolismo del propiconazol en plantas ocurre por oxidación de la cadena lateral unida al anillo dioxolano y por la pérdida del grupo dioxolano para formar un grupo alcohol, produciéndose reacciones similares del metabolismo de este fungicida en suelos y en mamíferos.

Por su parte, el comportamiento del bitertanol, ha sido estudiado en agua y en sedimento, comprobándose la rápida partición desde el agua al sedimento (60% en 2-3 horas). Es clasificado como escasamente móvil y como moderadamente persistente. Su degradación en suelo se produce mediante formación de CO₂, identificándose dos productos de degradación, *bitertanol-cetona* y *bitertanol-ácido benzoico*.

Por otra parte, el **paclobutrazol** es también considerado como un compuesto azólico de carácter fungicida, presentando en su molécula un anillo triazol. Sin embargo, es clasificado y frecuentemente utilizado como un regulador del crecimiento vegetal en árboles frutales y en plantas ornamentales. Además, es usado en el arroz para incrementar la germinación y, con ello, aumentar el nivel producción. Este compuesto es absorbido por las hojas y raíces, y actúa inhibiendo la biosíntesis de esterol y giberelina.

El paclobutrazol ha demostrado ser químicamente estable mediante ensayos de hidrólisis (pH 4-9) con luz ultravioleta a pH 7 con soluciones acuosas en un periodo de 10 días. También es considerado estable a la fotólisis de acuerdo con estudios realizados en suelos superficiales. A pesar de que no se han publicado estudios sobre su metabolismo en vegetales, la evaluación de residuos de paclobutrazol indica que este compuesto permanece como residuo principal en frutas tratadas. El metabolismo en animales (ratas) se produce por oxidación de la molécula de *ter-butil* formando *paclobutrazol-diol*.

Fungicidas Derivados de la Morfolina

Los fungicidas derivados de la morfolina son compuestos sistémicos, los cuales presentan actividad preventiva y curativa para el control de una amplia variedad de enfermedades fúngicas. Estos compuestos han sido caracterizados como inhibidores de la biosíntesis del ergosterol.

Son bastante estables a la degradación hidrolítica, pero susceptibles a la degradación fotolítica en suelos y al metabolismo vegetativo y animal. La hidroxilación y oxidación de uno de los grupos metilo en el anillo de morfolina (Figura 1.7), es el paso primario en la degradación del tridemorf, dando lugar al correspondiente alcohol y ácido carboxílico.

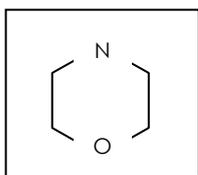


Figura 1.7. Anillo de morfolina

En estudios comparativos se ha visto que conforme aumenta la longitud de la cadena, crece la actividad fungicida, situándose en un máximo de alrededor de 12-13 carbonos.

En el caso del **tridemorf**, compuesto de interés en la presente Memoria, comprende una mezcla de isómeros de C_{11} - C_{14} , conteniendo el 60 - 70% de los isómeros del 4-tridecil (C_{14}), siendo principalmente utilizado en el control de enfermedades fúngicas en cereales y en bananas.

Fungicidas de Derivados Aromáticos

Es el caso de **o-fenifenol**, el cual ha sido clasificado como derivado aromático [10] debido a que no posee ninguna característica en común con fungicidas de alguna familia química en particular.

Este es un fungicida utilizado para el tratamiento post-cosecha en el control de enfermedades que aparecen durante el almacenamiento de frutas como cítricos, manzanas, frutos de pepita, tomates, pepinos y otros vegetales.

Muchas veces suele ser utilizado en forma de sales de sodio o potasio, puesto que posee mayor solubilidad en agua. El modo de acción de este fungicida es el típico de los fenoles.

Otros Fungicidas

Se incluyen dentro de este grupo de fungicidas ciertos compuestos a los cuales no se les ha asignado una clase química bien definida. Entre estos compuestos se han seleccionado dos fungicidas para su estudio, el dicloran y el clorotalonil. Sin embargo, dependiendo de la bibliografía, en algunos casos estos mismos compuestos pueden ser considerados fungicidas aromáticos, si se trata del clorotalonil, o nitroderivados, si se refiere al dicloran.

En general, el **clorotalonil** es un fungicida clorado, protector, no sistémico con un amplio espectro de acción, que encuentra aplicación en toda clase de cultivos (hortalizas, frutales, ornamentales, cereales y otros), sea sólo o asociado a otros fungicidas para reforzar su acción. Este fungicida actúa afectando las funciones enzimáticas del hongo por conjugación o depleción de los compuestos tioles como el glutatión, de manera que se produce la interrupción de la glicólisis y la producción de energía en el patógeno.

Por su parte, el **dicloran** es un fungicida no sistémico, cuya acción consiste más bien en perturbar la división celular. Actúa sobre varias enfermedades, aunque su uso conlleva ciertas limitaciones debido a la sensibilidad que presentan los estadios primerizos. Por ello, su empleo ha sido aconsejado sólo después de que los cultivos estén bien enraizados y cuando la planta presente algunas hojas verdaderas. Se ha empleado también en el tratamiento de semilla, sólo o unido a otros fungicidas. Su acción sobre el patógeno se produce por interferencia en la transferencia del complejo ácido ribonucleico hasta el ribosoma, inhibiendo la síntesis proteica del mismo.

1.2.7. Referencias

- [1] Bifani, P. (1999), *Medio ambiente y desarrollo sostenible*, Instituto de Estudios Políticos para América Latina y Africa (IEPALA), 4ª edición,

- Madrid, disponible en www.eurosur.org/medio_ambiente/bif62.htm, consultada el 6 de agosto de 2003.
- [2] Carbona, C. (1999), *Agricultura y Medio Ambiente*, Círculo de Lectores, Barcelona.
- [3] Coscollá, R. (2003), *El Control de los residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas frescas*, Seminario: Plaguicidas y seguridad alimentaria en frutas y hortalizas: problemas y alternativas, UIMP, Valencia.
- [4] *Datos destacables del mercado*, (2003), Asociación Empresarial para la Protección de las Plantas (AEPLA), disponible en www.aepla.es, consultada el 19 de agosto de 2003.
- [5] De la Cruz, E. (1999), *Presencia de agroquímicos en ecosistemas acuáticos de zonas costeras y análisis preliminar del riesgo ambiental*, Memorias del Simposio XX Años de Investigaciones, Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología (CIMAR) disponible en <http://cariari.ucr.ac.cr/~cimarucr/delacruz.htm>, consultado el 4 de agosto de 2003.
- [6] Coscollá, R. (1993), *Residuos de Plaguicidas en Alimentos Vegetales*, Mundi-Prensa, Madrid.
- [7] Barberá, C. (1989), *Pesticidas Agrícolas*, Ediciones Omega, 4ª edición, Barcelona.
- [8] *Aplicación de Plaguicidas*, (2002), Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Mundi-Prensa, España.
- [9] Fernández, M. (2001), Tesis Doctoral: *Evaluación de la toxicidad de plaguicidas en productos hortofrutícolas por técnicas cromatográficas*, Universidad de Valencia, Valencia.
- [10] Roberts, T., Hutson, D. (1999) *Metabolic Pathways of Agrochemicals*, part two, Insecticides and Fungicides, The Royal Society of Chemistry, United Kingdom.
- [11] Cremlyn, R. (1989), *Plaguicidas modernos y su acción bioquímica*, Limusa, México.
- [12] Tomlin, CDS. (1997), *The Pesticide Manual*, British Crop Protection Council, 11th edition, United Kingdom.

1.3. ANALISIS DE RESIDUOS DE FUNGICIDAS

La gran variedad de fungicidas, su amplio uso y la preocupación que genera la presencia de residuos en frutas y vegetales, conlleva a la necesidad de disponer de metodología analítica fiable que permita la determinación eficaz de estos residuos en diferentes matrices, con objeto de poder evaluar los riesgos existentes para la salud pública.

Como ya se ha comentado anteriormente, las autoridades reguladoras son las encargadas de asegurar que los residuos remanentes en los alimentos se encuentren dentro de los límites de tolerancia (LMR) establecidos. Para ello se llevan a cabo programas de control mediante el muestreo y el análisis de productos alimenticios naturales o procesados que se encuentran en el mercado. En respuesta a este requerimiento se han desarrollado numerosos métodos que se aplican rutinariamente para el control de residuos de plaguicidas en alimentos.

Al respecto, se ha dado preferencia a los métodos que permiten determinar residuos de varios compuestos en un solo procedimiento analítico, los denominados métodos multiresiduos (MRM), los cuales son aplicables a muestras cuyo tratamiento agroquímico es desconocido. Por otra parte, existen también métodos individuales (SRM) para algunos plaguicidas cuya determinación analítica no ha podido ser incluida dentro de los métodos multiresiduos.

Los SRM no suelen ser considerados adecuados para programas de control, pues obligaría a los laboratorios a aplicar muchos métodos para el control de muestras desconocidas, resultando más operativo el uso de MRM, que permiten la determinación de muchos compuestos a la vez. Además, las condiciones de estos métodos individuales suelen variar ampliamente para la determinación de compuestos incluso de una misma clase, de modo que un laboratorio requiere la disponibilidad de suficiente material de vidrio, pequeños equipos, así como sistemas cromatográficos y de detección para su aplicación.

Por lo general, los métodos empleados con propósitos reguladores deben cumplir ciertos requisitos, tal y como lo refleja la *Environmental Protection Agency* (EPA) dentro de algunas indicaciones proporcionadas para el desarrollo de este

tipo de metodología. Así, los métodos deben (a) requerir un máximo de 24 horas para su realización, (b) disponer fácilmente del equipamiento y los reactivos necesarios, (c) identificar los residuos de interés en presencia de otro tipo de residuos, y (d) permitir la detección de los residuos al nivel de los LMR establecidos o por debajo de estos. Por su parte, la *Food Safety and Inspection Service* (FSIS) de los Estados Unidos considera también, entre los criterios para el establecimiento de métodos analíticos, la inclusión de un sistema de aseguramiento de la calidad del método y la validación del mismo a través de estudios inter-laboratorio [1].

En todo caso, un método multiresiduos debe permitir la determinación de un amplio rango de plaguicidas en una diversa gama de productos alimenticios, siendo sensible, preciso y bastante exacto para su aplicación con propósitos reguladores y aceptable a la comunidad científica, además de ser económico, o por lo menos, asequible para los laboratorios en donde sea utilizado.

El desarrollo de los métodos multiresiduos puede resultar difícil, debido a las diferentes características (polaridades, solubilidades, volatilidades, valores de pK_a , etc.) de los compuestos que deben ser considerados para la extracción y el análisis simultáneo de los mismos [2]. En general, debido a la compleja naturaleza de las matrices en donde los analitos se encuentran presentes y a los bajos límites de detección exigidos por los organismos reguladores, la eficiente preparación de la muestra, y la identificación y detección a niveles de trazas, son aspectos importantes en un método analítico para el análisis de residuos de plaguicidas (ARP).

Por tanto, los métodos de análisis aplicados a productos vegetales requieren de un tratamiento previo para eliminar el mayor número de interferencias posibles, concentrar los analitos y favorecer la determinación de estos. A continuación, se resumen las diferentes etapas generales de las que constan estos métodos analíticos:

Etapa de extracción. Normalmente la extracción se lleva a cabo utilizando un disolvente miscible en agua seguido de la partición con un disolvente orgánico. Diferentes disolventes han sido utilizados en procedimientos multiresiduos, siendo la acetona, el acetato de etilo y el acetonitrilo los más habituales. Así pues, dependiendo del tipo de matriz, la extracción sólido-líquido o líquido-líquido han sido las técnicas de extracción más utilizadas, llevándose a cabo mediante agitación mecánica, trituración u homogeneización

con la ayuda de equipos como el Ultraturrax. En la etapa de partición, la mezcla de disolventes éter de petróleo-diclorometano (1:1, v/v) ha sido la más utilizada desde que la propusiera Luke et al. en 1975.

Otras alternativas más modernas para la extracción de plaguicidas son la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD), extracción por fluidos supercríticos (SFE), extracción en fase sólida (SPE), micro-extracción en fase sólida (SPME), extracción con disolventes mediante microondas (MASE). *Stir-bar sorptive extraction* (SBSE). Estas opciones de extracción pueden presentar también inconvenientes durante el tratamiento de la muestra o para la recuperación de los analitos en estudio. La inadecuada homogenización del pequeño tamaño de muestra durante la extracción por MSPD, la falta de reproducibilidad y presencia de interferentes de la matriz durante las extracciones por SFE, el tipo de muestra utilizada en la extracción con MASE, así como la limitada aplicación de extracciones por SPE, SPME o SBSE a muestras en estado líquido, han sido algunos de los inconvenientes a los que se hace referencia.

Etapas de purificación (clean-up). Los extractos pueden presentar múltiples interferentes propios de la matriz, los cuales pueden afectar la identificación y cuantificación de los analitos. En este sentido, las etapas de purificación suelen ser necesarias para conseguir la eliminación de los interferentes y reducir los límites de detección del método.

Las técnicas de purificación más utilizadas en el análisis de alimentos son la cromatografía de permeación en gel (GPC), la partición líquido-líquido usando diversos disolventes, y la SPE.

Las fases más utilizadas en GPC han sido *Bio-Beads SX-3* y *SX-8*, mientras que en SPE comúnmente se han utilizado gel de sílice, Florisil, alúmina e incluso fases poliméricas y de intercambio iónico, que retienen las sustancias interferentes más polares. Menor ha sido la frecuencia de la aplicación de SPE en fase reversa, siendo en estos casos la sílica modificada con el grupo octadecilo (C₁₈) el sorbente no polar más utilizado.

Cabe indicar que una de las alternativas propuestas para la mejora de métodos analíticos desarrollados ha sido la simplificación de la etapa de *clean-up*, eliminando de esta manera la manipulación de la muestra durante la

limpieza del extracto. Acortando el tiempo de análisis se evita la posible pérdida de los analitos, se reduce la utilización de disolventes y material de laboratorio y se reduce en definitiva el coste del análisis.

La aplicación de métodos con etapas de purificación menos extensas ha sido también consecuencia de la disponibilidad de sistemas de detección altamente específicos para el análisis de residuos, de manera que pueden permitir la presencia de los compuestos co-extraídos de la muestra. En cualquier caso, es preciso valorar la conveniencia de simplificar el método de análisis con instrumentación que, por otra parte, requerirá de mantenimiento posterior para la regeneración de las condiciones de operación iniciales y específicas.

En todo caso, los métodos de extracción suelen ir acompañados de la concentración del extracto mediante evaporación antes de su purificación y análisis, o bien para eliminar los disolventes que pueden interferir durante la detección de los analitos. El cambio de disolvente previo a la etapa de purificación o de inyección en el sistema cromatográfico es una práctica frecuente en el ARP y puede ser motivo de pérdidas de los analitos más volátiles.

Hasta aquí, las etapas de extracción, purificación y preconcentración constituyen lo que se conoce como *preparación de la muestra*, la cual suele ser la parte más problemática del análisis y la causa de muchos errores analíticos.

Etapas de separación y detección. El alto poder de resolución de las técnicas cromatográficas para la separación de un amplio número de plaguicidas con características físico-químicas similares, acopladas a sistemas de detección adecuadas, han hecho de ellas los sistemas más frecuentemente utilizados para la determinación analítica de los residuos de plaguicidas.

La incorporación en los años 60 de la cromatografía de gases (GC) al ARP revolucionó este campo de trabajo, ya que fue posible separar un número importante de plaguicidas simultáneamente, desarrollándose de este modo los primeros MRM. Posteriormente, en los años 70, se introdujo la GC capilar que con la incorporación de detectores muy sensibles y selectivos, como el de ionización de llama (FID), el de captura de electrones (ECD), el de nitrógeno-fósforo (NPD) o el detector fotométrico de llama (FPD), ha pasado a ser la

principal técnica utilizada en este tipo de análisis, principalmente para la determinación de compuestos relativamente volátiles, térmicamente estables y de baja polaridad [3].

Sin embargo, en la década de los 80 se empezó a potenciar el uso de la cromatografía líquida (LC) con detección por ultravioleta, y su aplicación en el campo del ARP se ha extendido considerablemente hasta nuestros días [4]. Esta técnica es principalmente utilizada para la determinación de compuestos poco volátiles, polares y/o termolábiles, cuya determinación por GC requiere de una o varias etapas previas de derivatización química. Posteriormente, con el desarrollo del detector de fluorescencia (FD) y del detector de barrido de diodos (DAD), el cual es capaz de medir simultáneamente todas las longitudes de onda posibilitando la obtención de un espectro completo cada 0.1 segundos, se ha incrementado el campo de aplicación de esta técnica proporcionando, además, una mayor selectividad a las determinaciones analíticas.

Más recientemente el detector de espectrometría de masas (MS) acoplado tanto a GC como a LC, ha permitido disponer de una herramienta básica en todo laboratorio de análisis de plaguicidas, al ser una técnica muy sensible y selectiva para la determinación de residuos. Actualmente, diversas técnicas de ionización son utilizadas en GC-MS; entre ellas, la de impacto electrónico (EI) es la técnica más popular porque permite la obtención tanto de iones moleculares como iones de fragmentación. Sin embargo, cuando el EI no proporciona la suficiente sensibilidad para el análisis de compuestos presentes en la muestra en cantidades muy pequeñas, la ionización química (CI) es la técnica más aconsejable puesto que produce la ionización controlada de los analitos. La producción de iones positivos o negativos mediante CI da lugar a las denominadas técnicas de ionización química positiva (PCI) e ionización química negativa (NCI) [5, 6].

Por su parte, las técnicas utilizadas rutinariamente para la introducción y análisis de muestras mediante LC-MS, comprenden (a) aquellas que introducen la muestra solamente en la fuente iónica del espectrómetro, como *particle beam*, y (b) aquellas que permiten la ionización suave de la muestra, como *thermospray* o *atmospheric pressure chemical ionization (electrospray, ionspray, atmospheric pressure chemical ionization)*. De esta manera, diferentes tipos de plaguicidas (carbamatos, fenilureas, triazinas, etc.) incluyendo fungicidas

benzimidazólicos, están siendo ampliamente estudiados mediante las técnicas de LC-MS [7].

Cabe destacar la capacidad de cada interfase en MS para proporcionar información útil para la identificación y confirmación de los analitos, gracias a la posibilidad de obtener información estructural. Se puede decir que ambas técnicas, GC y LC, son en la actualidad imprescindibles y complementarias en el campo del ARP, permitiendo abarcar entre las dos el análisis de un gran número de plaguicidas y de sus productos de transformación.

En muchos procedimientos descritos en la bibliografía la preparación de la muestra se lleva a cabo manualmente, resultando procedimientos tediosos, lentos y que conllevan mucha manipulación de muestra. Los efectos sobre la precisión y los riesgos de contaminación también son factores a tener en cuenta. Por ello, se ha intentado automatizar esta etapa en la medida de lo posible.

En el caso de muestras sólidas, los mayores esfuerzos de automatización se centran en la etapa de purificación mediante SPE o GPC, mientras que en muestras líquidas la automatización permite realizar la extracción, preconcentración y, a veces, la purificación, haciendo uso de sofisticados equipos.

En la última década se ha producido un desarrollo significativo de las técnicas cromatográficas con columnas acopladas, en la que dos o más sistemas cromatográficos se acoplan mediante una interfase adecuada [8, 9]. Las ventajas fundamentales son la automatización de las últimas etapas del análisis, esto es purificación, preconcentración y determinación analítica, y la mayor capacidad de resolución que se consigue al combinar dos columnas cromatográficas.

La aplicación de técnicas cromatográficas al ARP ha permitido el desarrollo de métodos analíticos muy sensibles, pudiendo determinarse los plaguicidas a los bajos niveles de concentración legislados por los diferentes organismos reguladores en frutas y vegetales.

A continuación, se realiza una revisión bibliográfica de los métodos analíticos propuestos para la determinación de residuos de fungicidas, incluyendo tanto métodos multiresiduos como métodos más selectivos desarrollados para compuestos individuales o grupos de compuestos con propiedades físico-químicas semejantes.

1.3.1. Métodos Multiresiduos

La mayoría de métodos MRM se basan en el uso de GC con diversos tipos de detectores, entre los cuales destaca la aplicación de MS en los últimos años. Sin embargo, también se ha hecho uso de la técnica de LC con el fin de determinar residuos de fungicidas mediante métodos multiresiduos, pero con menor alcance debido al número y tipo de plaguicidas analizados [10]. En todo caso, es cada vez mayor la aplicación de LC-MS a la determinación de fungicidas bencimidazólicos y otros compuestos polares [10-13].

Estos métodos multiresiduos han usado para la extracción diversos tipos de disolventes de variada polaridad, entre los que destacan acetonitrilo [12, 14-16], acetato de etilo [13, 17, 18] y acetona [19, 20]. Sin embargo, son también frecuentes las extracciones con mezclas de disolventes, con el fin de cubrir analitos con un amplio rango de polaridades. Entre estos se puede mencionar: acetonitrilo-etanol [21], acetona-diclorometano [18, 22, 23], acetona-éter de petróleo [24], hexano-acetato de etilo [25], agua-acetona [20], entre otros.

También se han descrito métodos de extracción por SPE como el propuesto por Wong et al [26] para imazalil, dicloran, bitertanol y clorotalonil, entre otros, en muestras de vino haciendo uso de cartuchos de intercambio iónico (HLB). Rodríguez et al. [27] también han descrito el uso de SPE con cartuchos de C₈ y elución con diclorometano para el análisis de 8 fungicidas, entre los cuales se ha incluido carbendazima, tiabendazol, imazalil y o-fenilfenol. En este caso la determinación analítica fue llevada a cabo por CE-DAD, obteniéndose recuperaciones de tan sólo 40-54% en tomates.

Se han descrito otros métodos de extracción, como el propuesto por Stajnbaher et al. [2] para 90 analitos (incluyendo bitertanol, imazalil, o-fenilfenol, propiconazol y tiabendazol) en columnas rellenas con *LiChrolut EN* y elución con acetato de etilo (conteniendo 1% de trietilamina) y acetato de etilo-

acetona (9:1), obteniendo recuperaciones satisfactorias (71-104%) en frutas y vegetales por GC-MS. Cabe mencionar que la presencia de trietilamina durante la elución de los analitos favoreció la recuperación de plaguicidas básicos como el imazalil, el cual incrementó su valor de recuperación desde 50 a 80%.

Algunos de los métodos oficiales como los del *Pesticide Analytical Manual* (PAM) [20] proponen para la extracción el uso de acetona o una mezcla agua-acetona, mientras que en el *Analytical methods for pesticide residues in foodstuffs* [18] del gobierno holandés se propone la extracción con acetato de etilo o acetona, dependiendo de los analitos a determinar y del tipo de matriz, permitiendo, en general, la recuperación de imazalil, propiconazol, tiabendazol, o-fenilfenol, bitertanol, clorotalonil y dicloran.

En lo que respecta a la purificación de los extractos, los métodos basados en GC requieren habitualmente una o varias etapas de clean-up. En general, estos métodos han hecho uso de SPE siendo las fases más utilizadas C₁₈ [14], aminopropilo [14, 26], *Envi-carb* [17, 21], de intercambio iónico [2, 12, 17, 21], y los rellenos poliméricos [21].

Los métodos oficiales de la PAM y del gobierno holandés proponen la purificación de extractos en ciertos casos, para lo cual hacen uso de columnas rellenas de carbón/celite/óxido de magnesio (dicloran), Florisil (clorotalonil) o cartuchos de fase C₁₈ (bitertanol y o-fenilfenol), u otros métodos como partición con diclorometano-éter de petróleo [20] o mediante GPC [18].

En el método propuesto por Sannino et al [19] para la determinación de bitertanol, propiconazol y dicloran, entre otros compuestos, se lleva a cabo el proceso de partición con acetato de etilo-ciclohexano (1:1), y complementa la purificación con GPC en columnas empacadas con *Bio-Beads SX-3*. Cabe mencionar, sin embargo, que las recuperaciones obtenidas de bitertanol fueron parciales, entre 60-68%, mientras que para imazalil fueron inferiores al 35%, en productos procesados de frutas.

Cabe mencionar el criterio para la aplicación del proceso de purificación propuesto en los métodos del gobierno holandés, según el cual se recomienda la omisión de la purificación de la muestra cuando los LMR de los analitos son relativamente altos y el extracto es relativamente limpio, especialmente en el caso de productos vegetales no grasos. Así, en el caso de los extractos vegetales

obtenidos por extracción con acetato de etilo, es posible la inyección directa de una alícuota del extracto sin previa concentración, a no ser que la sensibilidad del detector así lo requiera. Sin embargo, si los resultados del análisis indican la presencia de residuos por encima de los valores de LMR establecidos, se recomienda la confirmación de los resultados mediante MS o, en su lugar, la repetición del análisis aplicando la etapa de *clean-up*.

En cuanto a la etapa de medida por GC, cabe hacer referencia a algunos métodos multiresiduos que permiten la determinación de un gran número de plaguicidas, entre los cuales se incluyen ciertos fungicidas seleccionados.

Así, Stan [28] ha reportado la determinación de más de 400 pesticidas incluyendo o-fenilfenol, bitertanol, clorotalonil, dicloran, imazalil, paclobutrazol, propiconazol, tiabendazol y algunos metabolitos, mediante GC con ECD, NPD y MS, alcanzando niveles de detección por debajo de $0.01 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ en *full scan*. Fillion et al. [14] llevaron a cabo el análisis de 251 pesticidas (o-fenilfenol, clorotalonil, dicloran, imazalil y propiconazol) en frutas y vegetales mediante GC-MS con límites de detección entre $0.02\text{-}1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ para todos los compuestos. Fussell et al. [17] determinaron residuos de 106 pesticidas, entre ellos bitertanol, carbendazima, dicloran, imazalil y paclobutrazol, mediante GC-MS y HPLC-FD, validando el método en muestras de manzanas fortificadas a niveles de $0.05\text{-}0.1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Sheridan y Meola [21] han determinado también alrededor de 100 pesticidas (o-fenilfenol, propiconazol, dicloran y tiabendazol) en productos vegetales, frutas y leche. En este caso, la determinación de todos los compuestos fue posible mediante el análisis de $5 \mu\text{L}$ del extracto en dos inyecciones por GC-MS usando un equipo de trampa de iones.

Cabe destacar finalmente que la tendencia actual en el análisis de multiresiduos se centra en el aprovechamiento de las ventajas que brindan los acoplamientos GC-MS y LC-MS. La técnica LC-MS está ganando terreno en este campo y cada vez son más los trabajos en los que se aprovechan las excelentes prestaciones de esta técnica en el ARP. Así, se han descrito ciertos métodos mediante la introducción directa del extracto en el sistema cromatográfico sin la necesidad de etapas previas de purificación [10, 13]. Un método para la determinación de 38 plaguicidas incluyendo o-fenilfenol, carbendazima, tiabendazol, imazalil, propiconazol entre otros en muestras vegetales ha sido desarrollado por Taylor et al. [13]. A pesar de la inyección directa del extracto y

de la determinación inequívoca de los analitos por MS en condiciones isocráticas para la fase móvil, las recuperaciones de o-fenilfenol fueron del 63% en limones. Consecuentemente, en el mismo trabajo se plantea la necesidad de aplicar un método LC-MS alternativo con fase móvil diferente y con detección mediante *single ion recording* (SIR) m/z 169, para la confirmación de o-fenilfenol, obteniéndose recuperaciones del 80% en la misma matriz.

En la Tabla 1.5 se resumen algunos de estos métodos multiresiduos hasta ahora comentados.

Tabla 1.6. Métodos de análisis para la determinación de los fungicidas seleccionados

Analitos	Preparación de la muestra	Métodos de Detección	Características analíticas	Referencia
Bencimidazoles en tejido animal	Músculo: extracción de 3 g muestra + 1.5 g Na ₂ SO ₄ + 0.5 mL K ₂ CO ₃ 4 M + 5 mL AcEt. Fase orgánica evaporar a sequedad, disolver con 5 mL Hx + 1 mL etanol-HCl 0.2 N. Fase etanólica evaporar y redisolver con 0.5 mL acetato amonio a pH 5.5 + 0.5 mL MeOH . SPE en columnas de <i>styrol-diviny-benzene</i> (SDB) y elución con 3 mL MeOH-AcEt (1:4).	LC-MS (ESI)	Recup. TBZ 72% LOD 3 µg·Kg ⁻¹ LOQ 5 µg·Kg ⁻¹	Balizes, 1999 [32]
Carbendazima, tiabendazol en frutas	Extracción de 10 g muestra con 20 mL acetona, 20 mL DCM y 20 mL éter petróleo. Ajustar vol. a 50 mL. Alicuota de 2,5 mL para SPE en cartuchos de diol. Acondicionamiento con solución de elución: 2 mL MeOH-ác. fosfórico 0.1 M (1:1), a pH 7 con solución de NaOH 1 M.	HPLC-UV	Recup. MBC 103%, TBZ 104.5% LOD 0.06 mg·Kg ⁻¹	Tharsis et al., 1997 [33]
Benomilo, carbendazima, tiabendazol en alimentos varios	Extracción de 100 g muestra con 200 mL acetona. Alicuota de 5 mL para SPE en cartuchos de SCX acondicionados con MeOH y ác. fosfórico en MeOH-agua. Elución con ACN-tampón fosfato pH 6.	HPLC-FD/UV	Recup. MBC y TBZ 60-110%	Levine et al., 1998 [34]
Bencimidazoles en peras, manzanas, naranjas, uvas, kiwi, tomate, lechugas	Extracción de 50 g + 5g celite + 5 mL NH ₃ 20% + 20 mL acetato de etilo + 25 g Na ₂ SO ₄ . Conversión de tiofanato de metilo a carbendazima con dimetilformamida + NH ₃ 20% + NaOH 1 M. Conversión de benomilo en carbendazima durante extracción con AcEt en columnas de <i>Extrelut-20</i> . SPE en cartuchos de SCX. Elución MeOH-formiato de amonio 5 M a pH 6.8 (75:25).	HPLC-UV	Recup. MBC y TBZ 73-95% LOQ 0.01 mg·Kg ⁻¹	Di Muccio et al., 1995 [35]
Bencimidazoles en fresas, lechugas, manzanas, limones y uvas.	Extracción de 20 mL extracto de muestra (en agua-acetona) a través de cartuchos de <i>Extrelut-20</i> . Elución con 100 mL ác. fosfórico 0.1 M. SPE en cartuchos de SCX acondicionados con MeOH, ác. fosfórico 0.1 M. Elución con 2 mL ACN-MeOH-formiato de amonio 5 M a pH 6.8 (50:25:25)	HPLC-UV	Recup. MBC 90-100%, TBZ 72-97% LOQ 0.05-0.1 mg·Kg ⁻¹	Di Muccio et al., 1999 [36]

Tabla 1.6. Métodos de análisis para la determinación de los fungicidas seleccionados

Analitos	Preparación de la muestra	Métodos de Detección	Características analíticas	Referencia
Carbendazima y otros fungicidas en uvas blancas	Extracción de 60 g muestra con 100 mL DCM-acetona (75:25) + Na ₂ SO ₄ . SPE de alícuota de 20 mL evaporada y redisoluelta en isooctano. Cartuchos de <i>Sep Pak silica</i> y elución con 5 mL DCM-acetona (50:50)	HPLC-DAD	Recup. MBC 68% LOD 0.07 mg·Kg ⁻¹ LOQ 0.15 mg·Kg ⁻¹	Rial Otero et al., 2003 [22]
Bencimidazoles en productos procesados de frutas	Extracción de 50 g muestra con 100 mL HCl 0.02 N-MeOH (80:20). 20 mL del extracto diluido a pH 7.5 con NaOH dil. es purificado a través de <i>Extrelut-20</i> y eluido con 80 mL DCM.	HPLC-UV/FD	Recup. MBC y TBZ 90% LOD MBC y TBZ 0.01-0.001 mg·Kg ⁻¹	Sannino, 1995 [37]
Benomilo y carbendazima en productos apícolas	Miel: 1 g muestra + 3 mL HCl 0.05 M + 15 mL AcEt. Ceras: 1 g + 1 mL HCl 0.05 M + 15 mL MeOH. Polen: igual que ceras + purificación por partición con Hx. En todos los casos, evaporar y redissolver en 2 mL MeOH.	HPLC-FD	Recup. MBC 90% LOD 0.01-0.05 mg·L ⁻¹	Bernal et al., 1997 [38]
Carbendazima en arándanos	Extracción de 50 g muestra con 100 mL MeOH + 10 mL HCl 1 M (2 veces con 50 mL MeOH) + 100 mL NaCl 1% y ajustar a pH 9.5 con NH ₄ Cl. Partición con 100 mL DCM y purificación en columnas de alumina ácida y básica	HPLC-UV/FD	Recup. MBC 73-112% LOD 15 µg·Kg ⁻¹	Bushway et al., 1991 [39]
Carbendazima y tiabendazol en zumo de manzanas	Extracción por SPE de 10 mL de muestra diluidos 1:1 con agua previo ajuste de pH a 10 con NaOH. Cartuchos de SCX acondicionados con MeOH-NH ₄ OH 0.15 M. Lavado 1 con NH ₄ OH 0.15 M y lavado 2 con MeOH 30%-NH ₄ OH 0.15 M. + HCl 0.1 N y lavado 3 veces con MeOH antes de eluir con MeOH (NH ₄ OH 0.3 M).	LC-MS (ESI) LC-PDA (<i>Photodiode array detector</i>)	Recup. MBC 74% y TBZ 93% (MS) LOD (MS) 0.002 mg·Kg ⁻¹	Young et al, 2001 [40]
Bencimidazoles e imidacloprid en frutas y vegetales	Extracción de 15 g de muestra con 60 mL AcEt + 15 g Na ₂ SO ₄ . (Repetir extracción con 25 mL AcEt). 60 mL de extracto evaporar a sequedad y ajustar vol a 2 mL con ACN:agua (50:50).	LC-MS (ESI y APCI)	Recup. TBZ 95-108%, MBC 93-101% LOD 0.001 mg·Kg ⁻¹	Fernández-Alba et al, 2000 [41]
Carbendazima, tiabendazol y otros plaguicidas en manzanas y peras	Extracción de 10 g muestra + 10 mL acetato de amonio 3 M a pH 4.5 + 25 mL acetona-DCM-Hx (50:20:20). Evaporar extracto y ajustar a 1 mL con ACN-formiato de amonio 2 mM (50:50).	LC-MS (ESI)	Recup. MBC 72-93%, TBZ 61-82% LOD 0.01-0.02 mg·Kg ⁻¹ LOQ 0.02-0.05 mg·Kg ⁻¹	Lacassie et al, 1999 [42]

Tabla 1.6. Métodos de análisis para la determinación de los fungicidas seleccionados

Analitos	Preparación de la muestra	Métodos de Detección	Características analíticas	Referencia
Tiabendazol y procymidona en frutas y vegetales	Extracción 5 g muestra + 5 mL agua, sonicar 15 min. Extracto lavado y ajustado a 100 mL con agua purificar en columna C ₈ (100 x 9 mm i.d.) y eluir con 10 mL DCM. Evaporar extracto a sequedad y redisolver con 500 µL solución tampón (formiato de amonio 12 mM-ác. fórmico 20 mM a pH 3.5 con MeOH 2%).	CE-MS (APCI)	Recup. 61-68% LOQ 0.005 mg·Kg ⁻¹	Rodriguez et al., 2002 [30]
Bencimidazoles y 2,4-D en frutas y vegetales	Extracción SFE 12 g muestra a pH 8-9 + sol.K ₂ CO ₃ 50%, agitar. Mezclar con 8 g <i>hidromatrix</i> e introducir porción de 5g en cartucho de extracción. Extraer con CO ₂ supercritico a 55°C, eluir con acetonitrilo. Concentrar extracto a 1 mL + 100 µL sol.K ₂ CO ₃ 25%, derivatizar con 200 µL PFB-BR con calentamiento a 60°C 3h. Evaporar y disolver en 1 mL isoctano	HPLC-DAD GC-MS	Recup. MBC 91-93% LOD MBC-deriv. 3 µg·Kg ⁻¹	Anasassiades y Schwack, 1998 [31]
Tiabendazol y otros compuestos antihelminticos en leche	Extracción 5 mL muestra + 100 mL NaOH 10 M + 15 mL AcEt. Evaporar fase organica y ajustar a 1 mL con ác. fórmico 0.1%-ACN (50:50).	LC-MS (ESI)	Recup. TBZ 91-99% LOD 0.5 µg·L ⁻¹	De Ruyck et al, 2002 [43]
Carbendazima y otros plaguicidas en melocotones y nectarinas	Extracción de 15 g muestra + 100 mL AcEt + 50 g Na ₂ SO ₄ . (Repetir extracción con 100 y 25 mL acetato etilo). Evaporar extracto a sequedad y ajustar volumen a 10 mL con MeOH.	LC-MS (APCI)	Recup. MBC 64% LOQ 0.02 mg·Kg ⁻¹	Blasco et al., 2002 [44]
Tiabendazol y otros plaguicidas en frutas y vegetales	Extracción MSPD: 0.5 g muestra + 0.5 g C ₈ en columna de vidrio (100 x 9 mm i.d.). Eluir con 15 mL DCM. Evaporar extracto y redisolver con 0.5 mL MeOH	LC-MS (APCI)	Recup. TBZ 59-69% LOQ 0.04 mg·Kg ⁻¹ LOD 0.01 mg·Kg ⁻¹	Pous et al., 2001 [45]
Carbendazima, tiabendazol y otros plaguicidas en zumo de frutas	Extracción MSPD: 1 g muestra + 1 g tierra diatomeas en cartucho de 6 mL. Elución con 10 mL acetato de etilo. Evaporar extracto a sequedad y redisolver con 500 µL MeOH-agua (50:50)	LC-MS/MS (ESI)	Recup. MBC 84-96% TBZ 89-94% LOD (MBC) 0.6 y (TBZ) 0.15 mg·Kg ⁻¹	Perret et al , 2002 [46]

Tabla 1.6. Métodos de análisis para la determinación de los fungicidas seleccionados

Analitos	Preparación de la muestra	Métodos de Detección	Características analíticas	Referencia
Imazalil, propiconazol, tiabendazol y otros en cítricos	Extracción 20 g muestra + sol. NaOH 0.5N + Na ₂ SO ₄ + 75 mL Hx-AcEt (9:1), homogeneizar y filtrar. Extraer fase acuosa con 30 mL Hx-AcEt. Evaporar fases org y re-disolver en Hx-AcEt.	GC-NPD	Recup. 86-99% LOD 0.1 mg·Kg ⁻¹	Lafuente y Tadeo, 1987 [25]
imazalil y bencimidazoles en cítricos	Extracción 50 g + 60 g Na ₂ SO ₄ + 100 mL AcEt, homogeneizar y filtrar. Evaporar a menos de 2 mL + 10 mL ACN, evaporar casi a sequedad y redisolver a 10 mL en ACN-formiato de amonio 2 mM (50:50).	LC-MS (API, ESI)	Recup. 75-79% Fortif. 0.05-5 mg·Kg ⁻¹ LOD 0.02 mg·Kg ⁻¹	Fernández et al., 2001 [47]
carbendazima, bitertanol y otros en naranjas	Extracción SBSE: 5 g muestra + 5 mL MeOH + 5 mL agua, sonicar, filtrar, extraer con <i>stir bar</i> (2h). Lavar <i>stir bar</i> con agua y desorción con ACN. Extracción MSPD: 0.5 g muestra + 0.5 g C ₈ , acondicionar con agua dest. Eluir con 10 mL DCM, evaporar + 1 mL MeOH y evaporar a 0.5 mL. Extracción convencional: 50 g muestra + 50 g Na ₂ SO ₄ + 100 mL AcEt, homogeneizar y filtrar (repetir extrac.).Evaporar a sequedad y re-disolver con 10 mL MeOH.	LC-MS (APCI)	SBSE: Recup. (bit) 77-84%, LOQ 0.001-0.005 mg·Kg ⁻¹ MSPD: Recup (MBC) 47-53%, (bit) 72-73%, LOQ 0.008-0.3 mg·Kg ⁻¹ AcEt: (todos) 32-98%, LOQ 0.002-0.2 mg·Kg ⁻¹	Blasco et al., 2002 [49]
Tiabendazol, benomilo, o-fenilfenol entre otros en naranjas	Extracción 10 g muestra + 1 g acetato sódico anh. + 50 mL AcEt + Na ₂ SO ₄ . (Repetir extr. x2). Evaporar a 1 mL. SPE en tandem cartuchos SAX y PSA, eluir con AcEt.	LC-FD	Recup. (TBZ) 80-91% (OPP) 64-91% Fortif. 0.1-10 mg·Kg ⁻¹ LOD 0.01 mg·Kg ⁻¹	Yamazaki et al., 1999 [50]
Tiabendazol y otros plaguicidas en alimentos	Extracción con acetona y partición con DCM-éter petróleo (1:1). Evaporar extracto y redisolver con tolueno	LP-GC-MS	LOD 11-16 µg·Kg ⁻¹	Maštovská et al., 2001 [51]
Imazalil en limones	Extracción 10 g muestra + 30 mL Na ₂ SO ₄ + 3g Na ₂ CO ₃ + 50 mL AcEt, homogeneizar, filtrar y lavar (repetir extracción. Evaporar extractos a sequedad y re-disolver en 2 mL DCM. SPE en cartuchos de diol, elución con 10 mL MeOH.	GC-NPD GC-MS (c)	Fortif. 0.1-5 mg·Kg ⁻¹ Recup. 98-98% LOD 0.05 mg·Kg ⁻¹	Yamazaki y Ninomiya, 1996 [60]

Tabla 1.6. Métodos de análisis para la determinación de los fungicidas seleccionados

Analitos	Preparación de la muestra	Métodos de Detección	Características analíticas	Referencia
Imazalil en limones, naranjas y uvas	5 g muestra + 20 mL MeOH, homogeneizar 30 min, filtrar y diluir a 20 mL con MeOH. 1.2 mL de extracto + 4.8 mL tampón fosfato y purificar en columna IAC. Eluir con 2 mL tampón fosfato-MeOH (8:2) y 2 mL (6:4). Transferir extracto a 4 mL AcEt a pH básico, evaporar y redissolver con 1 mL ACN.	HPLC-UV	Recup. 85-99% Fortif. 0.05-5 mg·Kg ⁻¹	Watanabe et al., 2001 [53]
Imazalil y su mayor metabolito en cítricos	Extracción 10 g muestra + 50 mL acetona, homogeneizar, filtrar fase sup. y repetir extracción. Evaporar a 8 mL, ajustar pH 13-14 + 10 mL AcEt, mezclar y centrifugar. Repetir extracción. Secar extractos con 30 g Na ₂ SO ₄ , filtrar y concentrar a 1 mL. SPE en diol y elución con 8 mL AcEt-MeOH (1:1). Derivatizar residuos con 20 µL BSA (N,O-bis(tridimetilsilil)acetamida), mezclar, calentar a 90°C por 15 min, dejar enfriar y ajustar a 5 mL con Hx-piridina.	GC-ECD GC-MS (c)	Fortif. 0.02-2.5 mg·Kg ⁻¹ Recup. 95% LOD 0.01 mg·Kg ⁻¹	Matsumoto, 2001 [55]
Imazalil en tomates y pimientos	Extracción 20 g muestra a pH 10.5 con NaOH 5%, agitar 30 seg + 20 mL benceno, agitar y centrifugar. (pimientos + 2 g NaCl, agitar y centrifugar). 3 mL extracto bencénico + 5 ml SO ₄ H ₂ 0.5% de pH 1.5, agitar, centrifugar, separar fase bencénica y evaporar. + 3 mL benceno + 0.5 mL NaOH 5%, agitar, separar fase bencénica y secar sobre Na ₂ SO ₄ .	GC-ECD	Fortif. 0.07 – 2 mg·Kg ⁻¹ Recup. 90-96% (tomates) 74-79% (pimientos)	King et al., 1988 [56]
Imazalil y otros plaguicidas en peras	Extracción de muestra con etanol, secar y redissolver en agua y volver a extraer con éter dietílico. Evaporar, redissolver en 1 mL tolueno y concentrar a 0.2 mL. Filtrar un a alícuota antes de su análisis.	GC-NPD	Recup. 67-82% LOD 0.6-1.6 mg·Kg ⁻¹	López et al., 1999 [62]
Imazalil y otros en frutas, vegetales y arroz	Extracción por SFE de 5g muestra + 1 g celite + 1 g polímero <i>arasorb S-310</i> . Atrapar los analitos en columna rellena con <i>Extrelut NT</i> y C ₁₈ . Eluir con 40 mL ACN, evaporar y re-disolver con 2 mL Hx. SPE en tandem en columnas rellenas de PSA y Florisil. Elución con 50 mL acetona-Hx (1:1). Evaporar y re-disolver en 1 mL ACN.	LC-MS (ESI)	Recup. 66% (bananas), 62-84% (otras matrices) LOD 0.04 µg·Kg ⁻¹	Kaihara et al., 2002 [77]

Tabla 1.6. Métodos de análisis para la determinación de los fungicidas seleccionados

Analitos	Preparación de la muestra	Métodos de Detección	Características analíticas	Referencia
Imazalil, clorotalonil y otros plaguicidas en extractos de trigo, calabacín y naranjas	Extracción 50 g muestra + 250 mL AcEt + 100 g Na ₂ SO ₄ , homogeneizar, filtrar y lavar. Evaporar extractos a 30-40 mL, fortificar y llevar a 50 mL con AcEt. Alicuota de 2.5 mL diluir a 5 mL con ciclohexano. GPC de 2 mL del extracto en columnas de <i>PL gel</i> . Eluir con ciclohexano-AcEt (1:1) Fracción de elución (16-35 mL) concentrar a 0.5 mL y re-disolver en 1 mL tolueno.	GC-ECD-NPD	Recup. imaz. 15-65%, clorot. 69-107% Fortif.: imaz. 3.82 mg·Kg ⁻¹ Clorot. 0.11 mg·Kg ⁻¹	Kocoureck et al., 1998 [57]
Propiconazol y otros plaguicidas en vegetales	Extracción MSPD: 5 g muestra + 10 g florisil + 8 g arena acidificada, mezclar e introducir en columna (400 x 30 mm d.i.). Eluir con 50 mL DCM. Evaporar extracto a 10 mL + 1 mL MeOH y concentrar a 1 mL. Purificación en algunos casos de 1 mL extracto diluido a 100 mL con agua, en minicolumnas de C ₈ . Eluir con 5 mL AcEt.	GC-ECD GC-MS (EI) (c)	Fortif. 0.01-0.5 mg·Kg ⁻¹ Recup. 87% (tomate)	Viana et al., 1996 [59]
Imazalil y carbendazima en frutas y vegetales	Extracción 10 g muestra + 15 mL AcEt, agitar y centrifugar (repetir extracción). Lavar fracción orgánica con 10 mL NaCO ₃ H 5% y agua dest., descartar lavados. Extraer con 10 mL (x2) SO ₄ H ₄ 0.025 M y lavar fases acuosas ác. con 15 mL AcEt. Ajustar fase acuosa a pH 8 con NaOH 1 M + 10 mL (x2) AcEt. Filtrar fases orgánicas sobre Na ₂ SO ₄ lavar con 10 mL AcEt y llevar a 30 mL. Evaporar 15 mL extracto y re-disolver en fase móvil: ACN-agua-NH ₄ OH (15:85:0.6) e inyectar en HPLC Evaporar 15 mL extracto y re-disolver en 0.5 mL Hx e inyectar en GC	HPLC-UV GC-NPD GC-MS (c)	Fortif. 0.04-1 mg·Kg ⁻¹ Recup. imaz. 92-100%, MBC 77-82 LOD: imaz 0.005 mg·Kg ⁻¹ MBC 0.01 mg·Kg ⁻¹	Garrido et al., 1997 [61]
Imazalil, tiabendazol y otros plaguicidas en naranjas	Extracción 50 g muestra + 100 mL AcEt + 50 g Na ₂ SO ₄ , homogeneizar 2 min y filtrar (repetir extracción). Evaporar a menos de 5 mL y diluir a 10 mL con AcEt. Inyectar 1 µL en GC. Evaporar 2 mL y re-disolver en 10 mL ACN e inyectar 5 µL en LC.	GC-MS (EI) LC-MS (APCI)	Recup. imaz. 96% (GC), 90 % (LC), TBZ 95% (LC) LOD imaz. (GC) 0.05, (LC) 0.04 y TBZ 0.01 mg·Kg ⁻¹	Fernández et al., 2001 [66]

Tabla 1.6. Métodos de análisis para la determinación de los fungicidas seleccionados

Analitos	Preparación de la muestra	Métodos de Detección	Características analíticas	Referencia
Propiconazol y otros plaguicidas en pasto, manzanas, trigo, harina, aceite de maíz, aceite de oliva, semillas de calabaza	(A) Muestras no grasas: 10 g + 66 mL acetona, llevar a 100 mL con agua y homogeneizar, +3 g celite, filtrar. Diluir 5 mL extracto a 80 mL con agua. SPE en PS-DVB, eluir con 4 mL AcEt. Secar extracto y purificar en columna de Florisil. Concentrar a 4 mL. (B) Muestras grasas: 0.5 g + 1 g silica, mezclar e introducir en columna PS-DVB + 2mL ACN saturado con Hx. Sonicar columna y eluir con 3 mL ACN saturado con Hx.. Secar extracto a través de columna de Florisil y Na ₂ SO ₄ . Evaporar y re-disolver en AcEt.	GC-ECD GC-MS (NCI)	Fortif. (A) 1-4, (B) 0.05-0.2 mg ·Kg ⁻¹ Recup. 100-108% (A), 89-104% (B) LOD 0.01-0.03 mg ·Kg ⁻¹	Niessner et al., 1999 [58]
Propiconazol y tebuconazol en hojas y aceite de menta	Hojas: Extracción 5 g muestra + 25 mL MeOH, homogeneizar (3 x 10 seg), sonicar 15 min y agitar 45 min. Un mL extracto es inyectado directamente. Aceite: 20 mg muestra diluir con 1 mL MeOH e inyectar.	GC-MS	Fortif. 0.2-110 mg ·Kg ⁻¹ Recup. 83-87%	Garland et al., 1999 [68]
Imazalil, propiconazol y otros plaguicidas en frutas y vegetales	Extracción convencional: 0.5 g muestra + 10 mL acetona-agua (1:1), homogeneizar en ultrasonidos 15 min y filtrar. Extracto + 50 mL agua pasar por cartuchos de C ₁₈ o GCB. Extracción MSPD: 0.5 g muestra + 0.5 g C ₁₈ o GCB e introducir en columna (100 x 9 mm i.d.) con 0.5 g silica. Eluir en todos los casos con 10 mL AcEt para C ₁₈ o tolueno para GCB. Extracto concentrar a 0.5 mL.	GC-ECD-MS(EI)	R(%). imaz: 71-95 (MSPD-C ₁₈), 85-105 (MSPD-GCB), 50-66 (L-L); R(%). prop. 88-96 (MSPD-C ₁₈), 69-101 (MSPD-GCB), 55-85 (L.L) LOD 0.02-0.05 mg·Kg ⁻¹	Torres et al., 1997 [69]
Imazalil y tiabendazol en cítricos y bananas	Cítricos: Extracción 5 g muestra + 20 g Na ₂ SO ₄ + 1.5 g NaPO ₃ H + 30 mL AcEt homogeneización y centrifugar (repetir extracción con 20 mL AcEt). Bananas: Extracción con aprox. el doble de volúmenes. SPE en tandem con cartuchos silica y PRS, acondicionar con agua y MeOH, lavar con AcEt, MeOH y NaCl 0.1 M. Elución con 10 mL fase móvil: ACN-MeOH-agua (4:3:3) conteniendo tridecano sulfonato sódico 10 mM ajustado a pH 2.5 con ác. fosfórico.	HPLC-UV	Recup. imaz. 93-100%, TBZ 92-103% Fortif.0.2-10 mg·Kg ⁻¹ LOD 0.05 -0.1 mg·Kg ⁻¹	Ito et al, 1998 [71]

Tabla 1.6. Métodos de análisis para la determinación de los fungicidas seleccionados

Analitos	Preparación de la muestra	Métodos de Detección	Características analíticas	Referencia
Bitertanol y otros en ciruelas pasas	Extracción 10 g muestra + 10 mL Hx, agitación, separación de fases e inyección directa del extracto orgánico.	GC-NPD	Linealidad entre 0.01-1 mg·Kg ⁻¹ , r > 0.998	Cabras et al., 1998 [63]
Imazalil y tiabendazol en naranjas	Extracción 5 g muestra + 2 g NaCl + 10 mL AcEt-Hx (1:1), agitar 20 min. Secar extracto orgánico sobre Na ₂ SO ₄ .	GC-TSD	Recup. imaz. y TBZ 79-103%, LOD 0.2 mg·Kg ⁻¹	Navickiene et al., 1999 [65]
Propiconazol y otros plaguicidas en vino y fresas	Extracción SPME: Fresas: 25 g de muestra + 40 mL agua dest., homogeneizar. Fase acuosa llevar a 100 mL con NaOH 20%. SPME de 5 mL de alícuota en fibra de poliacrilato (PA) con agitación a 50°C, 45 min. Vino: alícuota de 5 mL de una muestra filtrada y diluida 1:2 con NaOH 20%	GC-MS (EI)	Fortif. 5 µg·Kg ⁻¹ , Repetib. 3-2%, Reproduc. 7-8%, LOD 0.03 µg·Kg ⁻¹	Zambonin et al., 2002 [67]
Propiconazol y otros en varios tipos de nueces	Extracción 20 g muestra + 100 mL acetona. Evaporar extractos + 100 mL sol. saturada NaCl + 100 mL Hx. Evaporar y partición con 30 mL Hx-MeCN y 30 mL MeCN-Hx. Evaporar extracto y redissolver en 20 mL Hx. SPE de 5 mL extracto en cartuchos florisil y eluir con 5 mL Hx, 5 mL acetona-Hx (17:3) y 5 mL Hx-acetona (1:1). Evaporar y re-disolver con 2 mL Hx. Fracción 2 contiene propiconazol.	GC-MS	Fortif. 0.2 mg·Kg ⁻¹ Recup. 88-104%	Kawasaki et al., 1996 [70]
Bitertanol en fresas	Extracción 10 g muestra + 100 mL AcEt + 40 g Na ₂ SO ₄ , homogeneizar y filtrar (repetir extracción con 100 mL AcEt) Evaporar extracto y disolver en AcEt. SPE en tandem con cartuchos SAX y aminopropil. Elución con 6 mL AcEt. Evaporar y redissolver en 5 mL MeOH.	LC-FD GC-MS (c)	Fortif. 0.05-1 mg·Kg ⁻¹ Recup. 92-99% LOD 0.01mg·Kg ⁻¹	Yamazaki et al., 1998 [76]
Dicloran y otros funguicidas e insecticidas en frutas y vegetales	Extracción 5-20 g muestra + 13 mL acetona-sol tampón fosfato (12:1) + 5 mL Hx, agitar mecánicamente. Purificar en sistema automático 2 mL fase org. en col. carbón, evaporación de eluato con N ₂ en 5 mL agua dest. Introducir extracto acuoso en col con C ₁₈ , elución con AcEt. Evaporar.	GC-ECD GC-MS (c)	Recup 82-98% Fortif. 5-25 µg·Kg ⁻¹ LOD 0.1 µg·Kg ⁻¹	Columé et al., 2000 [78]

Tabla 1.6. Métodos de análisis para la determinación de los fungicidas seleccionados

Analitos	Preparación de la muestra	Métodos de Detección	Características analíticas	Referencia
Dicloran y otros plaguicidas organoclorados en pimientos y pepinos	Extracción 50 g muestra + 80 g Na ₂ SO ₄ + 100 mL AcEt, homogeneizar 5 min, filtrar sobre 20 g Na ₂ SO ₄ (repetir extracción 2 veces). Evaporar a sequedad + 10 mL éter petr.-acetona (9:1). Purificación 5 mL extracto en coll. Florisil con Na ₂ SO ₄ previamente saturado con éter petr. Eluir 100 mL éter petr.-éter dietílico 30%. Evaporar a 1-2 mL y diluir 5 mL éter petr.	GC_ECD	Recup. 95% (pimientos) 94% (pepinos), Fortif. 0.1-0.4 mg·Kg ⁻¹ LOQ 0.1 mg·Kg ⁻¹	Valverde-García et al., 1991 [79]
Clorotalonil en pimientos, tomates y pepinos	Extracción 10 g muestra + 200 mL ACN, homogeneizar y filtrar. Partición del extracto con 100 mL éter petr., agitar + 10 mL sol. saturada NaCl + 600 mL agua dest. Lavar fase acuosa 2 veces con agua y filtrar extractos org con 10 g Na ₂ SO ₄ . Evaporar a 1-2 mL y diluir a 10 mL con éter petr.	GC-ECD GC-MS (c)	Recup 82-99% Fortif. 0.01-0.51 mg·Kg ⁻¹ LOQ 0.01 mg·Kg ⁻¹	Valverde Garcia et al. 1993 [80]
Clorotalonil en raíces, hojas y suelo	Extracción 10-20 g muestra + 2 g Na ₂ SO ₄ + 0.3 mL H ₃ PO ₄ 50% + 60 mL acetona, homogeneizar 2 min, filtrar y lavar 3 veces con acetona. +120 mL Na ₂ SO ₄ , extraer con 30 mL éter petr. (x3) y evaporar a 3 mL. Purificar en col. Florisil, eluir con 50 mL éter petr.-DCM-acetona (9.7:10:0.2). Evaporar a sequedad + 10 mL éter petr., concentrar a 1 mL + acetona a 10 mL.	GC-ECD	Recup. 83-91% LOD 0.001-0.005 mg·Kg ⁻¹	Zhao et al., 1996 [81]
Dicloran y otros plaguicidas en solución patrón	Inyección directa 1-5 µL sol. patrón (en Hx, MeOH, AcEt o acetona) en precolumna sílica (metil desactivada) no polar de 15 m x 0.53 mm d.i.	GC-ECD	Conc. sol patrón 0.1-1.4 mg·Kg ⁻¹ Incremento de señal	Jiménez et al., 2001 [83]
Dicloran y otros plaguicidas en vino	Extracción 0.5 mL muestra en C ₁₈ preacondicionado con AcEt y eluir con 2 mL AcEt.	GC-MS	Recup. 92% Fortif. 250 µg·L ⁻¹ LOD 2 µg·L ⁻¹	Soleas et al., 2000 [86]
Dicloran, o-fenilfenol en cerezas, limones, naranjas y melocotones	Extracción por SPME de 1g muestra previamente homogeneizada con acetona-agua (5:1). Evaporar acetona hasta 1 mL de extracto + 300 mg NaCl antes de extraer con fibra <i>Carbowax/templated resin</i> . Desorción estática con MeOH-agua (70:30)	LC-MS	Recup. (dic) 59-79%, (OPP) 47-59% Fortif. 0.5-5 µg·Kg ⁻¹ LOD (DAD) 0.25-0.5, (MS/MS) 0.5-5 µg·Kg ⁻¹	Blasco et al., 2003 [91]

Tabla 1.6. Métodos de análisis para la determinación de los fungicidas seleccionados

Analitos	Preparación de la muestra	Métodos de Detección	Características analíticas	Referencia
Clorotalonil, imazalil y otros en fresas	Extracción Clorot: 25 g muestra + Na ₂ SO ₄ + 125 mL acetona-éter petr. (1:1). Evaporar 2 mL extracto con 25 µL decano y disolver en 1 mL acetona-isooctano (3:7). Extracción Imaz: 25 g muestra + Na ₂ SO ₄ + 125 mL acetona-éter petr. (1:1). Evaporar 5 mL extracto y redisolver en ACN-tampón fosfato pH 2 (2:8).	GC-NPD (Clorot) LC-UV (Imaz)	Recup. (clorot) 109% (imaz) 84% LOQ 0.05 mg·Kg ⁻¹ .	Stensvand y Christiansen, 2000 [24]
Clorotalonil y otros plaguicidas en frutas y vegetales	Extracción 50 g + 50 mL 2-propanol + 100 mL éter petr., homogeneizar y filtrar. Lavar extracto con 5 mL sol. saturada Na ₂ SO ₄ y mL 150 mL agua dest (repetir x3). Secar fase org sobre Na ₂ SO ₄ y analizar.	GC-ECD-FPD-ELCD-XSD	Efecto del proceso de lavado de productos agrícolas tratados en la reducción de la concentración de plaguicidas	Krol et al., 2000 [82]
Clorotalonil y otros plaguicidas en frutas y vegetales	Extracción 50 g muestra + 105 mL DCM, homogeneizar 2 min + 80 g Na ₂ SO ₄ y filtrar a través de Na ₂ SO ₄ . Evaporar a sequedad y re-disolver con 5 mL ciclohex. Diluir 1 mL extracto a 2 mL con ciclohex.	GC-MS/MS (ITD-EI-CI)	Recup. 83-89% (pepinos) Fortif. 0.13-0.3 mg·Kg ⁻¹ LOD 5.4x10 ⁻⁴ mg·Kg ⁻¹	Martínez-Vidal et al., 2002 [87]
Clorotalonil y otros plaguicidas en frutas y vegetales	Extracción 50 g muestra + 105 mL DCM, homogeneizar 2 min + 80 g Na ₂ SO ₄ y filtrar a través de Na ₂ SO ₄ . Evaporar a sequedad y re-disolver con 5 mL ciclohex. Diluir 1 mL extracto a 2 mL con ciclohex.	GC-MS/MS (ITD-EI-CI)	Recup. 71-74% (pepinos) Fortif. 0.13-0.5 mg·Kg ⁻¹ LOD 4.8x10 ⁻⁴ mg·Kg ⁻¹	Martínez-Vidal et al., 2002 [88]
Clorotalonil y propiconazol en tgomates, pepinos y pimientos	Extracción 15 g muestra + 50 mL DCM, homogeneizar 2 min + 50 g Na ₂ SO ₄ , filtrar y evaporar a sequedad. Re-disolver en 5 mL y 1 mL diluir a 2 mL con ciclohexano.	LP-GC-MS/MS (EI)	Recup. clorot. 112-115%, prop. 115-127%, Fortif. 0.02-0.5 mg·Kg ⁻¹ , LOD (clorot) 1.9 y (prop) 6.4 µg·Kg ⁻¹	Arrebola et al., 2003 [89]
Clorotalonil y otros plaguicidas en pimientos	Extracción 15 g muestra + 60 mL AcEt. + 13 g Na ₂ SO ₄ , homogeneizar + 30 mL AcEt. Evaporar a sequedad 30 mL de extracto y re-disolver 5 mL AcEt.	GC-MS/MS (PCI-NCI)	LOD 0.01 µg·Kg ⁻¹	Hernando et al., 2001 [90]

Tabla 1.6. Métodos de análisis para la determinación de los fungicidas seleccionados

Analitos	Preparación de la muestra	Métodos de Detección	Características analíticas	Referencia
Clorotalonil, dicloran y otros en frutas y vegetales	Extracción ASE de 8 g muestra + 5 g <i>hidromatrix</i> , eluir con acetona-DCM (3:1). Separar fase org + 10 g Na ₂ SO ₄ anh. Fase acuosa + 15 mL NaCl 5%, partición con 20 y 10 mL DCM. Combinar fases org. + 60 g Na ₂ SO ₄ y lavar 2 veces con 20 mL DCM. Evaporar a sequedad y re-disolver con 2 mL Hx. SPE en tandem con columna Florisil y cartucho <i>Envi-carb</i> . Eluir con 6 mL Hx.DCM-acetona (10:60:30). Concentrar y disolver en Hx.	GC-ECD-FPD GC-MS (c)	Recup. (dic) 96-117%, (clorot) 86-101%, Fortif. 0.05-0.1 mg·Kg ⁻¹ , LOD (clorot) 0.02 y (dic) 0.005 mg·Kg ⁻¹	Adou et al., 2001 [23]
Clorotalonil y otros plaguicidas en pimientos y tomates	Extracción SFE de 20 g muestra + 28 g MgSO ₄ anh. Introducir en cartucho relleno con 1g MgSO ₄ . Eluir con 15 mL CO ₂ a 50°C, 300 atm y 200 µL MeOH como modificador.	HPLC-UV GC-ECD-NPD	Recup. 86-90% (pimientos), 81-87% (tomate), Fortif. 0.1-0.5 mg·Kg ⁻¹	Valverde-García et al., 1996 [84]
Dicloran, clorotalonil en frutas y vegetales	Extracción 50 g muestra + 100 mL ACN, homogeneizar y filtrar. SPE en cartucho C ₁₈ Transferir extracto + 10 mL sol. tampón fosfato, agitar. Fase org. Evaporar con adición de ACN y redisolver a 5 mL acetona. Analizar por GC. Alicuota 2 mL concentrar casi a sequedad y redisolver con 1 mL MeOH 1% en DCM. SPE en cartucho aminopropilo y lavar extracto con 1 mL MeOH 1% en DCM. Evaporar casi a sequedad y redisolver a 1 mL con ACN-agua (1:1) Analizar por LC.	GC-FPD-ELCD LC-FD	Recup. (dic) 97-107%, (clorot) 24-64%. No se pudo recup clorotalonil en zanahorias, brócoli y melón	Lee et al., 1991 [85]
Dicloran, o-fenilfenil y otros en naranjas, bananas, limones y cardos	Extracción MSPD: 0.5 g muestra + 0.5 g C ₈ , acondicionar con agua dest. Eluir con 10 mL DCM, evaporar extracto y redisolver en MeOH	LC-MS (APCI) LC-UV	LC-MS: Recup. (OPP) 51-88%, (dic) 41-85%, LOQ 0.01 mg·Kg ⁻¹ .	Blasco et al., 2002 [92]
o-Fenilfenil y otros plaguicidas en frutas y vegetales	Extracción de la muestra con ACN + NaCl, homogeneizar 30 min. Transferir el extracto a acetona antes de su análisis	GC-MS	Recup. 65-77%, Fortif. 0.025-0.888 mg·Kg ⁻¹ , LOD 11-15 µg·Kg ⁻¹	Yu et al., 1997 [96]

Tabla 1.6. Métodos de análisis para la determinación de los fungicidas seleccionados

Analitos	Preparación de la muestra	Métodos de Detección	Características analíticas	Referencia
o-Fenilfenol y otros fungicidas en manzanas y naranjas	250 g muestra + 5 g NaCOO-CH ₃ + Na ₂ SO ₄ + 40 mL AcEt, homogeneizar y filtrar (repetir extracción). Agitar 3 min extracto con 40 mL H ₂ SO ₄ , adicionar Na ₂ SO ₄ a la fase org y filtrar. Concentrar a 3 mL adicionando 1-butanol.	HPLC-FD	Recup. 97-120% (manzanas), 84% (naranjas), Fortif. 0.5-0.25 mg·Kg ⁻¹ , LOD 0.005 mg·Kg ⁻¹	Saad et al., 2004 [93]
o-Fenilfenol, tiabendazol y difenil en cítricos	Extracción OPP por destilación de 50 g muestra + 200 mL agua + 50 g NaCl + 2 mL H ₃ PO ₄ + aceite de silicona +3 mL tolueno. Llevar a reflujo 2 h, enfriar + 50 mL ACN y filtrar. Extracción TBZ con 10 g muestra + 3 g Na ₂ HPO ₄ + 10 g Na ₂ SO ₄ + 80 mL AcEt, homogeneizar y filtrar (repetir homogeneización con AcEt). Adicionar 5 mL 2-etoxi-etilactate, agitar y concentrar a 5 mL. Diluir a 20 mL con MeOH	HPLC-FD	Recup. (OPP) 98-100%, LOQ 0.05 mg·Kg ⁻¹	Motohashi et al, 1991 [94]
o-Fenilfenol y fenilhidroquinona en cítricos	Hidrólisis de la muestra con HCl 1N, destilación 2 h y extracción con iso-octano. Derivatizar con N,N-bis (trimetil silil) trifluoro acetamida (BSTFA).	GC-MS	Recup. 83-95% LOQ 0.05 mg·Kg ⁻¹	Johnson eta al., 2001 [95]
o-Fenilfenol y otros plaguicidas en frutas	Extracción por SPME de 15 g muestra previamente homogeneizada con 0.5 mL NaOH 0.1M + 5 mL acetona. Filtrar y evaporar fase acuosa + 250 mg NaCl a pH 2 con HCl antes de SPME con fibra CW/TPR. Desorción con 100 µL MeOH con sonicación 15 min + 0.5 mL tampón antes de análisis.	CE-MS	Recup. 60-69% (naranjas) LOQ 3 mg·Kg ⁻¹ LOD 10 mg·Kg ⁻¹	Rodriguez et al., 2003 [97]
o-Fenilfenol, tiabendazol e imazalil en cítricos	Extracción 5 g muestra + 20 g Na ₂ SO ₄ + 1.5 g Na ₂ HPO ₄ + 50 mL AcEt, homogeneizar, centrifugar y analizar mediante inyección de 1 µL extracto sobrenadante.	Low injection ES-MS/MS	Recup. (OPP) 62-100%, (TBZ) 100-103%, (imaz) 99-112%, LOQ (OPP) 5, (TBZ, imaz) 1 mg·Kg ⁻¹	Ito et al., 2003 [98]

1.3.2. Métodos más Selectivos

Fungicidas Bencimidazólicos

Para los principales compuestos de la familia bencimidazólica, carbendazima y tiabendazol, se han propuesto numerosos métodos analíticos que permiten tanto la determinación individual o conjunta de ambos fungicidas, como la determinación simultánea junto con otros fungicidas (principalmente benomilo, tiofanato de metilo, imazalil, o-fenilfenol, etc), herbicidas y/o insecticidas, en diferentes muestras de vegetales y frutas, productos procesados (zumos, conservas, etc.), leche, miel, y ciertos productos de origen animal como músculo de cerdo.

Así, se han propuesto procedimientos mediante inmunoensayos [29] o CE [30] para la determinación de tiabendazol. Sin embargo, los bencimidazoles han sido analizados preferentemente mediante LC, aunque en ocasiones se ha utilizado la GC previa derivatización. En este caso, se ha descrito la determinación mediante GC de carbendazima previa derivatización con pentafluorobencilo [31], y de tiabendazol después de la bencilación o metilación del compuesto, tal como se indica en el trabajo de Balizs [32].

La técnica analítica comúnmente utilizada para el análisis de estos compuestos ha sido LC con detector de fluorescencia, UV o MS [22, 29, 31-50]. Se ha descrito que durante la separación cromatográfica en columnas de tipo C₁₈, tiabendazol y carbendazima tienden a formar picos anchos y con cola debido a la absorción de los compuestos sobre la fase estacionaria por interacción entre los átomos de nitrógeno de las moléculas bencimidazólicas y los grupos residuales de silanol de la sílica. Muchos autores recurren a la adición de compuestos aminos (soluciones de formiato o acetato de amonio) en la fase móvil [32, 41, 42, 45, 47] para minimizar el ensanchamiento de banda. También se ha hecho uso de soluciones tampón (soluciones de fosfato) para llevar a cabo la adecuada separación de los analitos en fase normal [34, 38] o formadores de pares iónicos para la separación en fase reversa [37]. El uso de columnas con fases C₁₈ tratadas para eliminar los grupos silanol residuales (tipo Kromasil) es otra alternativa. En otros casos, se ha optado por el empleo de columnas con relleno polimérico del tipo *poly(vinyl alcohol)* (*Ultracarb ODP-50*)

[22, 35, 36, 39] o *poly(alkylmethacrylate)* (Shodex DE-613) [48] para mejorar la calidad de la separación y simplificar las condiciones cromatográficas.

Maštovská et al. [51] reportan un método para la determinación de tiabendazol, entre otros plaguicidas, mediante inyección directa del extracto a baja presión en el sistema de cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (LP-GC-MS). El extracto vegetal disuelto en tolueno fue inyectado directamente a baja presión con aplicación de vacío, obteniéndose para el tiabendazol una mejor forma de pico frente a la GC-MS convencional.

Tiabendazol y carbendazima han sido analizados más recientemente mediante detección por MS acoplada a LC, tanto utilizando una interfase APCI [41, 44, 45, 47, 49], como ESI [32, 40-42, 46, 47]. En todos estos casos, el modo de ionización positiva ha permitido obtener una mejor fragmentación de la moléculas protonadas.

En cuanto a la extracción de ambos fungicidas, se han utilizado diferentes disolventes o mezclas como acetona [34], diclorometano-acetona [22], acetona-diclorometano-hexano [42], acetato de etilo [41, 43, 44, 47], siendo necesario en algunos casos, después de la extracción con acetona aplicar una partición con diclorometano-éter de petróleo [33, 48].

Otros métodos propuestos para el análisis de tiabendazol se basan en la aplicación de técnicas de extracción mediante fluidos supercríticos [31], MSPD [45, 46, 49] o SBSE [49].

Algunos de los métodos propuestos incluyen etapas de clean-up por SPE utilizando cartuchos de fase diol [33, 48], y de intercambio iónico [34-36, 50]. Cuando se utilizan cartuchos de fase diol es necesario su acondicionamiento con metanol-ácido fosfórico (disolución de elución), ya que la presencia del ácido debilita los enlaces polares de los grupos hidroxilos de la fase diol, evitando la interacción de estos con los grupos residuales silanol. En cuanto al uso de cartuchos de intercambio iónico se basan en que la carbendazima y el tiabendazol son capaces de formar cationes a pH bajo, produciéndose la retención selectiva de los compuestos debido a una interacción iónica sobre grupos de ácido bencensulfónico.

Hay que señalar que la carbendazima es un producto de la degradación natural del benomilo que puede producirse durante la etapa de preparación de

la muestra o como consecuencia de la conversión inducida del benomilo mediante hidrólisis ácida. Por lo tanto existen métodos para la determinación de benomilo que se basan en la detección final de carbendazima. Así, es posible retener el benomilo pasando el extracto de muestra a través de columnas rellenas con tierras diatomeas (*Extrelut-20*) [35] o sobre cartuchos de fase intercambio catiónico [34], eluyéndose posteriormente con una solución de ácido clorhídrico o ácido fosfórico. La determinación de carbendazima requiere la alcalinización del extracto a pH 8. También se ha descrito la conversión de tiofanato de metilo a carbendazima. Así, Di Muccio 95 et al. [35] han determinado metiltiofanato como carbendazima después de la extracción con acetato de etilo en medio básico y ciclación del metiltiofanato mediante adición de dimetilformamida (DMF).

Por otra parte, con la miniaturización de la preparación de la muestra, se han propuesto métodos nuevos para la determinación de fungicidas. Las extracción por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) y *stir bar sorptive extraction* (SBSE) han sido estudiadas por Blasco et al. [49] en cítricos para el análisis de carbendazima y bitertanol, entre otros, mediante LC-MS (APCI). El método por MSPD consistió en la homogeneización de muestra con igual cantidad de fase C₈, siendo introducida la mezcla obtenida en columna de vidrio y eluyendo los analitos con diclorometano. El método por SBSE consistió en la homogeneización de la muestra con 5 mL de agua y 5 mL de metanol en ultrasonidos, y extracción de los analitos introduciendo una pequeña barra magnética revestida de PDMS en la mezcla homogeneizada. La desorción de los compuestos se realizó con acetonitrilo. La aplicación de SBSE no resultó adecuada para la determinación de carbendazim, mientras que por MSPD tan sólo se recuperó alrededor del 45%. Los resultados obtenidos para bitertanol fueron similares por ambos métodos, en el orden de 72-84%. Sin embargo, la técnica por SBSE, demostró mayor sensibilidad (1-5 µg·Kg⁻¹) que la técnica de MSPD (8-300 mg·Kg⁻¹).

Fungicidas Azólicos

Aunque para algunos de estos fungicidas (propiconazol, bitertanol, paclobutrazol) han sido propuestos métodos basados en otro tipo de técnica de

análisis como electroforesis capilar [52] o (imazalil) mediante métodos de inmunoensayos [53, 54] generalmente, imazalil, propiconazol, bitertanol y paclobutrazol se suelen determinar mediante GC con sistemas de detección como ECD [55-59], NPD [57, 60-64], TSD [65], o MS [58, 66-70]. Estos métodos son en algunos casos individuales, mientras que en otros se trata de métodos que permiten la determinación de varios compuestos de interés. Por otra parte, la determinación por LC con detección por UV [53, 54, 61, 71-75], FD [76] o MS [66, 77] también ha sido reportada sólo para el análisis de imazalil, bitertanol y paclobutrazol.

En cuanto a la extracción, es habitual el uso de acetato de etilo [57, 60, 61, 66, 71, 74, 76], aunque otros disolventes o mezclas, como benceno [56], hexano [63], acetato de etilo-hexano [65], metanol [68], metanol-agua [72, 73], acetona [55], acetona-agua [58, 69], etanol [62], han sido también utilizados para la determinación de los fungicidas seleccionados, indistintamente, como parte de métodos más o menos complejos.

Cabe mencionar la aplicación de otros métodos de extracción para el análisis de estos fungicidas, como extracción por MSPD [59, 69, 75] o SFE [77]. Además, propiconazol ha sido determinado también mediante aplicación de SPME con fibra de poliacrilato [67] en fresas y vino.

Para la purificación de los extractos se han aplicado las técnicas de partición líquido-líquido [62], SPE o GPC. Así, la purificación de extractos por SPE ha incluido el empleo de cartuchos diol para la determinación de imazalil [55, 60], cartuchos Florisil para la determinación de propiconazol [58, 70] y paclobutrazol [73], C₈ [59], sílica o PRS [71] para la determinación de propiconazol, cartuchos aminopropilo [76] para determinación de bitertanol, y de intercambio iónico para determinación de paclobutrazol [73] y bitertanol [76].

En un estudio para evaluar la estabilidad de imazalil, clorotalonil y otros compuestos a partir de extractos vegetales, Kocoureck et al. [57] proponen un método que incluye una etapa de purificación mediante aplicación de GPC. Sin embargo, los valores de recuperación de imazalil fueron inferiores al 65% en las matrices estudiadas, atribuyéndose a pérdidas durante el proceso de purificación.

Cabe destacar el uso de MS como sistema de detección para fungicidas [58, 66-70], tanto acoplada a GC como a LC. Así, Fernández et al. [66], han desarrollado un método para la determinación de fungicidas en naranjas, incluyendo imazalil y tiabendazol, que se basa en la determinación analítica mediante GC-MS o con LC-MS (APCI) y hacen una comparación de ambas técnicas. Generalmente, la GC con ionización por impacto electrónico ha sido el sistema más frecuentemente utilizado para la determinación de bitertanol, propiconazol e imazalil. Sin embargo, en este trabajo, se lleva a cabo la determinación de imazalil por LC-MS usando interfase APCI con ionización negativa. Así, la separación cromatográfica de imazalil en presencia de sales de amonio en la fase móvil durante la determinación conjunta con tiabendazol por LC-MS (APCI negativo), permitió la estabilización del tiempo de retención del compuesto y de su forma de pico, aumentando la eficiencia en la separación de los dos fungicidas y la reproducibilidad de la señal. Los valores de recuperación obtenidos para imazalil fueron similares entre 90-96% por ambos sistemas de detección, y límites de detección entre 0.04 y 0.05 mg·Kg⁻¹ por LC-MS y GC-MS, respectivamente.

Fungicidas derivados de la Morfolina

En lo que respecta a la determinación de tridemorf en general, a pesar de la importancia que reviste este fungicida por su gran nivel de aplicación la literatura científica aporta escasa metodología de análisis. De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada, únicamente en el manual *Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs* propuesto por *Ministry of Public Health, Welfare and Sports* de Holanda, se ha encontrado la referencia de un método para la determinación de tridemorf en cereales [18]. Este método, está basado en la propuesta realizada por el propio fabricante del fungicida (BASF), requiere de un alto grado de manipulación de la muestra, incluyendo etapas de extracción con acetona, partición líquido-líquido, destilación, tratamiento con naranja de metilo y extracción final con cloroformo antes de la determinación espectrofotométrica del compuesto a 510 nm. De acuerdo con la aplicación de este método, han sido reportados valores de recuperación entre 77-103% de tridemorf y un LOD de 0.05 mg·Kg⁻¹.

Adicionalmente, el fabricante también ha propuesto un método basado en la determinación analítica por GC-MS con aplicación a cereales y suelos. Sin embargo los detalles de esta metodología no se encuentran disponibles en la literatura.

Otros Fungicidas

Dicloran y clorotalonil son dos compuestos típicamente analizados mediante GC acoplada a ECD [23, 78-84], FPD [82, 85], NPD [24, 84] y MS [86-90]. EN algunos casos, MS ha sido utilizada tan sólo como técnica de confirmación [23, 78, 80] de los resultados obtenidos mediante otros detectores.

Estos métodos cromatográficos con límites de detección desde $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (mediante detector de MS) han permitido la determinación de ambos fungicidas con suficiente sensibilidad. La aplicación de LC como técnica analítica para estos fungicidas ha sido menos frecuente, reportándose la detección por MS para la determinación de dicloran [91, 92], FD [85] o UV [23, 96] en el caso de dicloran y clorotalonil.

Técnicas de extracción convencional, mediante la adición de diversos disolventes orgánicos, han sido ampliamente utilizadas en estos casos. Acetato de etilo [79, 90], acetonitrilo [80, 85], acetona [78, 81], diclorometano [87-89], propanol-éter de petróleo [82] y acetona-éter de petróleo [24] han sido los extractantes regularmente seleccionados en los métodos de análisis consultados.

También se han propuesto métodos de extracción mediante SPE es el caso de la determinación de dicloran y otros plaguicidas en vino utilizando cartuchos de C_{18} [86].

La extracción de clorotalonil mediante SFE ha sido también propuesta [84] en un método multiresiduos aplicado a tomates y pimientos, realizándose la determinación mediante GC-ECD con recuperaciones entre 81-90% para este compuesto.

También se ha aplicado la extracción por MSPD para la determinación de dicloran y o-fenilfenol entre otros compuestos [92]. En este caso, los resultados obtenidos dependieron de la matriz, siendo más favorables en frutas (70% en

naranjas, aproximadamente) que en vegetales (40-50% en cardos) para ambos fungicidas. Así mismo, se ha descrito la aplicación de *accelerated solvent extraction* (ASE) [23] para la determinación de ambos fungicidas en frutas y vegetales, obteniéndose recuperaciones satisfactorias y un LOD de 0.02 mg·Kg⁻¹ para dicloran y 0.005 mg·Kg⁻¹ para clorotalonil.

Blasco et al. [91] han desarrollado un método de extracción por SPME con fibras de silica-Carbowax para la determinación de dicloran entre otros fungicidas como OPP en frutas. Las muestras fueron analizadas por LC-DAD-MS/MS, siendo el método bastante sensible con valores de LOD de 0.25-1 mg·Kg⁻¹ con detección por DAD y 0.5-10 µg·Kg⁻¹ por MS/MS.

Por otra parte, la SPE también ha sido aplicada como sistema de purificación de extractos vegetales, tanto en la determinación de dicloran extraído con acetato de etilo [79], como en la determinación de clorotalonil [81] previamente extraído con acetona en medio ácido y sometido a partición con solución sulfato de sodio al 2% y éter de petróleo. Ambos métodos hicieron uso de columnas rellenas con Florisil, habiendo llevado a cabo la elución de dicloran con éter de petróleo conteniendo 30% de éter dietílico, mientras que la elución de clorotalonil se efectuó con éter de petróleo-diclorometano-acetona (9.7:10:0.2, v/v/v).

Columé et al. [78] han descrito un método de purificación automatizado para la determinación rápida, simple y eficaz de dicloran y otros plaguicidas organoclorados en pimientos y pepinos. El método consistió en la purificación de extractos vegetales en columnas rellenas con fase C₁₈ después de la extracción con acetona-solución tampón de fosfato (12:1) y hexano. Cabe indicar que, la optimización del proceso de purificación también se llevó a cabo mediante evaluación de otras fases como Florisil, silica gel, carbón activado, alúmina, *Serdolit*, *LiChrolut-EN* y *Amberlites* con dilución del extracto en acetona, acetonitrilo o acetato de etilo. Sin embargo los resultados obtenidos en estos casos no fueron satisfactorios. La recuperación de dicloran bajo condiciones óptimas fue de 82-98% con un LOD de 0.1 µg·Kg⁻¹ por GC-MS.

En algunos métodos, principalmente aquellos para la determinación de clorotalonil, se ha descartado la aplicación de procesos de purificación, planteándose como alternativa el uso combinado de carbofrit y detección por

MS [87, 88], obteniéndose de este modo cromatogramas bastante limpios y una determinación selectiva de los analitos. Al respecto, Arrebola et al han [89] desarrollado un método con aplicación de GC-MS/MS a baja presión y la inyección directa de un volumen grande (10 μ L) de extracto utilizando una pre-columna de silica desactivada y carbofrit en el puerto de inyección para la determinación de clorotalonil y propiconazol entre otros plaguicidas en muestras vegetales. La aplicación de estas condiciones ha favorecido la selectividad, sensibilidad y el reducido tiempo de análisis al eliminarse procesos de purificación complejos. Los resultados obtenidos indicaron valores de recuperación de 112-115% para clorotalonil y 115-127% para propiconazol en muestras fortificadas entre 0.02 y 0.5 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, con valores de LOD de 0.002 y 0.1 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ para clorotalonil y propiconazol, respectivamente.

Fungicidas Derivados Aromáticos

Se han descrito métodos por LC con detectores FD o UV para la determinación de o-fenilfenol [93, 94] y, más recientemente, con sistemas de detección por MS, como los comentados con anterioridad [91, 92]. Al respecto, durante la determinación mediante LC-MS, el o-fenilfenol se ha caracterizado como un compuesto de difícil fragmentación permaneciendo prácticamente intacto su ión precursor durante la disociación conducida por colisión con argón.

La técnica de GC-MS también ha sido utilizada para la determinación de este fungicida [95, 96], además de otros métodos ya comentados basados en GC con otra determinación, MECK y CE en los que se incluye la determinación de o-fenilfenol junto con otros plaguicidas entre los que figuran algunos fungicidas de interés, principalmente imazalil, tiabendazol y carbendazim (fungicidas post-cosecha en cítricos).

La determinación de o-fenilfenol por GC ha significado en algunos casos la aplicación de procesos complejos durante la preparación de muestras previamente al análisis cromatográfico. Así, Johnson et al. [95], han desarrollado un método basado en la adición de HCl 1M a la muestra (cítricos), con hidrolización a reflujo y extracción con iso-octano. El extracto se derivatiza con

N,N-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) previamente al análisis por GC-MS.

En cuanto a la extracción, se han descrito la utilización de disolventes como acetonitrilo [93] y acetato de etilo [96]. También se ha propuesto un método basado en SPME y posterior determinación en CE-MS que permite la determinación de cinco plaguicidas ácidos entre los cuales se incluye el o-fenilfenol [97]. La extracción consistió en la homogeneización de la muestra con una solución de acetona-agua (5:1), filtración y evaporación de acetona previamente a la extracción de los analitos con una fibra *Carbowax/templated resins (CW/TPR)*. Los valores de recuperación obtenidos fueron del orden de 60-69% para o-fenilfenol y un LOD de 3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Cabe señalar el método desarrollado para la determinación de fungicidas incluyendo o-fenilfenol en cítricos mediante *flow injection* ESI-MS/MS [98], sin separación cromatográfica. El método consistió en la inyección directa de un extracto vegetal obtenido mediante homogeneización de la muestra con acetato de etilo con ionización en modo negativo para o-fenilfenol, que es un compuesto de baja ionización. En este caso la ionización se vio favorecida cuando se utilizó como fase móvil metanol con un 10% de agua. La recuperación de los tres fungicidas analizados fue del orden de 77-101% con coeficientes de variación de 0.7-4.2% en muestras fortificadas a niveles de 10 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ para o-fenilfenol y tiabendazol y 5 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ para imazalil.

En la Tabla 1.6, se resumen las principales características de los métodos de análisis descritos para la determinación de los fungicidas de interés.

Tabla 1.5. Métodos multiresiduos para la determinación de fungicidas de interés.

Análitos	Preparación de la muestra	Métodos de Detección	Características analíticas	Referencia
250 plaguicidas: imazalil, propiconazol, dicloran, clorotalonil, o-fenilfenol y otros en frutas y vegetales	Extracción 50 g muestra + 10 g NaCl + 100 mL ACN, homogeneizar. SPE 2 mL extracto en C ₁₈ , eluir + Na ₂ SO ₄ , agitar, centrifugar, transferir 10 mL y concentrar a 0.5 mL. + SPE en tandem con cartucho aminopropilo – columna carbón. Eluir con 20 mL ACN-tolueno (3:1). Concentrar y redisolver en acetona a 2.5 mL.	(Imazalil, dicloran y clorotalonil) GC-MS (EI), Carbendazima y tiabendazol) LC-FD	Recup. 70-120% Fortif. 0.1-1 mg·Kg ⁻¹ , LOD 0.02-10 mg·Kg ⁻¹	Fillion et al., 2000 [14]
101 plaguicidas: bitertanol, imazalil, propiconazol, dicloran, clorotalonil y otros en frutas y vegetales	Método de Fillion et al., 2000	GC-MS	Recup. 73-95%, Fortif. 0.1-1 mg·Kg ⁻¹ , LOD 0.02-0.25 mg·Kg ⁻¹	Kyoung-Chun et al., 2003 [15]
19 plaguicidas: bitertanol, propiconazol, clorotalonil en frutas	Extracción 20 g muestra + 40 mL acetona + 7 g NaCl. Partición con 20 mL AcEt-ciclohx (1:1), homogeneizar y centrifugar. Evaporar 50 mL extracto filtrado y lavado, y diluir a 9 mL con AcEt-ciclohx (1:1). GPC de extracto en <i>Biobeads</i> SX3, eluir AcEt-ciclohx (1:1).	GC-NPD-ECD GC-MS (c)	Recup. (clorot y prop) 82-89%, (bit) <35%, Fortif. 0.005-0.5 mg·Kg ⁻¹ .	Sannino et al., 1999 [19]
120 plaguicidas: tiabendazol, propiconazol, dicloran, o-fenilfenol en frutas, vegetales y leche	Extracción 50 g + 100 mL ACN-EtOH (95:5), agitar + 15 g NaCl + 15 g Na ₂ SO ₄ agitar, centrifugar y concentrar 30 mL a 5 mL. SPE en tandem en columnas de <i>Envi-carb</i> , SAX y PSA. Eluir con 4 vol. de 10 mL ACN-tolueno (3:1). Concentrar a 1 mL + 10 mL acetona, concentrar a 2 mL y llevar a 5 mL con MeOH, concentrar a 1 mL.	GC-MS/MS	Datos de conc. en muestra: (dic) 0.0006- 0.77 mg·Kg ⁻¹ , (TBZ) 0.79 mg·Kg ⁻¹ .	Sheridan y Meola, 1999 [21]
153 plaguicidas: imazalil, bitertanol, dicloran, clorotalonil y otros en vino	Extracción en cartuchos HLB de 20 mL muestra diluida con 20 mL agua dest. SPE en cartucho de aminopropilo con MgSO ₄ conectada en tandem a la columna de extracción. Eluir con 5 mL AcEt-Hx (80:20, 50:50 y 20:80). Concentrar extracto a 0.1 mL + 1 mL AcEt con 0.1% aceite maíz.	GC-MS	Recup. (bit) 84-61%, (clorot) 30-69%, (dic) 87-102%, Fortif. 0.01- 0.01 mg·Kg ⁻¹ , LOD 0.5-4 mg·Kg ⁻¹ .	Wong et al., 2003 [26]

Tabla 1.5. Métodos multiresiduos para la determinación de fungicidas de interés.

Analitos	Preparación de la muestra	Métodos de Detección	Características analíticas	Referencia
90 plaguicidas: tiabendazol, imazalil, propiconazol, bitertanol, o-fenilfenol en naranjas	Extracción en columna rellena de <i>LiChrolut EN</i> de 10 g muestra previamente homogeneizada con 20 mL acetona. Eluir con 2 mL AcEt conteniendo 1% de trietilamina y 3 alicuotas de mL AcEt-acetona (9:1). Evaporar y redissolver en acetona. SPE (opcional): columna rellena con fase de intercambio aniónico DEA + MgSO ₄ anh. conectada en tandem a la columna <i>LiChrolut EN</i> .	GC-MS	Recup. 71-104%, Fortif. 0.02-0.5 mg·Kg ⁻¹ , LOD 0.01 mg·Kg ⁻¹ .	Štajnbaher y Zupancič-Kralj, 2003 [2]
106 plaguicidas: carbendazima, tiabendazol, bitertanol, dicloran, paclobutrazol y otros en manzanas	Extracción bitertanol y dicloran: muestra + Na ₂ SO ₄ + NaCO ₃ H + 200 mL AcEt. SPE de 10 mL extracto en cartuchos <i>Envi-carb</i> . Concentrar extracto y redissolver en 1 mL AcEt. Extracción carbendazima y tiabendazol: Evaporar alícuota de 10 mL de extracto en AcEt (s/SPE) a sequedad y redissolver en MeOH-ác. acético (95:5). SPE en cartuchos SCX y eluir con MeOH-NH ₃ -agua (95:2.5:2.5). Concentrar extracto antes de análisis.	(Bitertanol y dicloran) GC-MS (EI), Carbendazima y tiabendazol) LC-FD	Recup. (bit y dic) 77- 105%, (MBC y TBZ) 93%, Fortif. 0.05-0.1 mg·Kg ⁻¹	Fussell et al., 2002 (50) [17]
17 plaguicidas: carbendazima, tiabendazol, imazalil, propiconazol, bitertanol y otros en manzanas y albaricoques	Extracción 12.5 g muestra + 50 mL ACN, homogeneizar. Concentrar 4 mL extracto, diluir con 2.5 mL ACN y ñevar a 50 mL con agua dest. SPE grupo A (analitos de interés): en cartucho MCX, eluir con 4 mL acetato de amonio 1M-MeOH. SPE grupo B en cartucho HLB, eluir con 4 mL ACN. Evaporar extractos y disolver en 1 mL MeOH-agua (1:1)	LC-MS/MS (ESI)	Recup. 80-100%, Fortif. 0.025-0.25 mg·Kg ⁻¹ , LOD 0.1-3 µg·Kg ⁻¹	Zrotlíková et al., 2003 [12]

Tabla 1.5. Métodos multiresiduos para la determinación de fungicidas de interés.

Analitos	Preparación de la muestra	Métodos de Detección	Características analíticas	Referencia
5 plaguicidas: imazalil, imazalil- metabolito, tiabendazol, o- fenilfenol y otros en cítricos	Extracción 10 g muestra homogeneizada previamente con agua + 10 g NaCl, ajustar a pH 12 con NaOH 1 M + 25 mL éter dietílico, agitar y centrifugar (repetir extr.). Lavar fase org. con agua. Filtrar con papel tratado con silicona. Evaporar con 3 mL MeOH y ajustar vol. a 5 mL con MeOH.	LC-MS LC-UV	Recup. (imaz) 71-78%, (TBZ) 82-100%, (OPP) 76-94%, Fortif. 1 mg·Kg ⁻¹ , LOD 0.01 mg·Kg ⁻¹	Yoshioka et al., 2004 [10]
38 plaguicidas: carbendazima, tiabendazol, imazalil, propiconazol, o- fenilfenol y otros en frutas y vegetales	Extracción 8 g muestra + NaCO ₃ H + 50 mL AcEt, homogeneizar (repetir extrac x2). Evaporar extracto y re-disolver en MeOH	LC-MS	Recup. (TBZ) 72-92%, (MBC) 66%, (imaz) 68-77%, (prop) 80%, (OPP) 63-70%, Fortif. 0.01-0.8 mg·Kg ⁻¹	Taylor et al., 2002 [13]
8 fungicidas: carbendazima, tiabendazol, imazalil, o-fenilfenol en uvas, lechugas, naranjas y tomates	Extracción SPE: 5 g muestra + 5 mL MeOH + 5 mL agua dest., sonicar, filtrar, lavar residuo con agua dest. Extracto a 100 mL con agua dest y pasar por Cs. Eluir con 10 mL DCM. Evaporar y re-disolver en sol. Tampón.	CE-DAD (MEKC)	Recup (MBC) 54%, (TBZ) 53%, (Imaz) 47%, (OPP) 40% en tomates	Rodríguez et al., 2001 [27]

1.3.3. Referencias

- [1] *Pesticides residues in food: Technologies for detection*, OTA-F-398, (1988), U.S. Congress, Office of Technology Assessment, Washington DC., United States, disponible en <http://www.wws.princeton.edu/cgi-bin/byteserv.prl/~ota/disk2/1988/8830/883008.PDF>, consultada el 7 de agosto de 2003.
- [2] Štajnbaher, D., 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*, J. Chromatogr. A, 1015, 185-198.
- [3] Van der Hoff, G.R., Van Zoonen, P. (1999), *Trace analysis of pesticides by gas chromatography*, J. Chromatogr. A, 843, 301-322.
- [4] Hogendoorn, E., Van Zoonen, P. (2000), *Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis*, J. Chromatogr. A, 892, 435-453.
- [5] Santos, F.J., Galceran, M.T. (2003), *Modern developments in gas chromatography-mass spectrometry-based environmental analysis*, J. Chromatogr. A, 1000, 125-151.
- [6] Eiceman, G.A., Hill, H.H.Jr., Gardea-Torresdey, J. (1998), *Gas Chromatography*, Anal. Chem., 70, 321R-339R.
- [7] Picó, Y., Font, G., Moltó, J.C., Mañes, J. (2000), *Pesticide residue determination in fruit and vegetables by liquid chromatography-mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 882, 153-173.
- [8] Hogendoorn, E., Van Zoonen, P. (1995), *Coupled-column reversed-phase liquid chromatography in environmental analysis*, J. Chromatogr. A, 703, 149-166.
- [9] Bovanová, L., Brandšteterová, E. (2000), *Direct analysis of food samples by high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 880, 149-168.
- [10] Yoshioka, N., Akiyama, Y., Teranishi, K. (2004), *Rapid simultaneous determination of o-phenylphenol, diphenyl, thiabendazole, imazalil and its major metabolite in citrus fruits by liquid chromatography-mass spectrometry*

- using atmospheric pressure photoionization, *J. Chromatogr. A*, 1022, 145-150.
- [11] Fernández, M., Picó, Y., Mañes, J. (2002), *Analytical methods for pesticide residue determination in bee products*, *J. Food Protec.*, 65, 1502 – 1511.
- [12] Zrostlíková, J., Hajšlová, J., Kovalczuk, T., Štěpán, R., Poustka, J. (2003), *Determination of seventeen polar/thermolabile pesticide in apples and apricots by liquid chromatography/mass spectrometry*, *J. AOAC Int.*, 86 (3), 612-622.
- [13] Taylor, M., Hunter, K., Hunter, K.B., Lindsay, D., Le Bouhellec, S. (2002), *Multi-residue method for rapid screening and confirmation of pesticides in crude extracts of fruits and vegetables using isocratic liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, 982, 225-236.
- [14] Fillion, J., Sauvé, F., Selwyn, J. (2000), *Multiresidue method for the determination of 251 pesticides in fruits and vegetables by GC/MS and HPLC/fluorescence*, *J. AOAC Int.*, 83 (3), 698-713.
- [15] Kyoung Chun, O., Gon Kang, H., Hee Kim, M. (2003), *Multiresidue method for the determination of pesticides in korean domestic crops by gas chromatography/mass selective detection*, *J. AOAC Int.*, 86 (4), 823-831.
- [16] Lee, S.M., Papathakis, M.L., Feng, H-M. C., Hunter, G.F., Carr, J.E. (1991), *Multi-pesticide residue method for fruits and vegetables: California Department of Food and Agriculture*, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 339, 376-383.
- [17] Fussell, R., Jackson, K., Reynolds, S., Wilson, M. (2002), *Assessment of the stability of pesticides during cryogenic sample processing. 1. Apples*, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 441-448.
- [18] *Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs*, (1996), General Inspectorate for Health Protection from the Ministry of Public Health Welfare and Sport, Ed. P. van Zoonen, Part 1, The Netherlands.
- [19] Sannino, A., Bandini, M., Bolzoni, L. (1999), *Multiresidue determination of 19 fungicides in processed fruits and vegetables by capillary gas chromatography after gel permeation chromatography*, *J. AOAC Int.*, 82 (5), 1229-1238.

- [20] *Pesticide Analytical Manual (PAM)*, (1999), U.S. FDA, Center for Food Safety and Applied Nutrition Office of Plant and Dairy Foods and Beverages, Volume I, 3rd edition, U.S., disponible en <http://vm.cfsan.fda.gov/~frf/pami3.html>, consultada el 4 de noviembre de 2003.
- [21] Sheridan, R., Meola, J. (1999), *Analysis of pesticide residues in fruits, vegetables, and milk by gas chromatography/tandem mass spectrometry*, J. AOAC Int., 82 (4), 892-990.
- [22] Rial Otero, R., Cancho Grande, B., Simal Gándara, J. (2003), *Multiresidue method for fourteen fungicides in white grapes by liquid-liquid and solid phase extraction followed by liquid chromatography-diode array detection*, J. Chromatogr. A, 992, 121-131.
- [23] Adou, K., Bontoyan, W., Sweeney, P. (2001), *Multiresidue method for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables by accelerated solvent extraction and capillary gas chromatography*, J. Agric. Food Chem., 49 (9), 4153-4160.
- [24] Stensvand, A., Christiansen, A. (2000), *Investigation on fungicide residues in greenhouse-grown strawberries*, J. Agric. Food Chem., 48 (3), 917-920.
- [25] Lafente, M., Tadeo, J. (1987), *GLC Multiresidue analysis of postharvest fungicides in citrus fruit*, Fresenius J. Anal. Chem., 328, 105-107.
- [26] Wong, J., Webster, M., Halverson, A., Hengel, M., Ngim, K., Ebeler, S. (2003), *Multiresidue pesticide analysis in wines by solid-phase extraction and capillary gas chromatography-mass spectrometric detection with selective ion monitoring*, J. Agric. Food Chem., 51, 1148-1161.
- [27] Rodríguez, R., Picó, Y., Font, G., Mañes, J. (2001), *Analysis of post-harvest fungicides by micellar electrokinetic chromatography*, J. Chromatogr. A., 924, 387-392.
- [28] Stan, H-J. (2000), *Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. State-of-art use of modified DFG-multimethod S19 and automated data evaluation*, J. Chromatogr. A, 892, 347-377.
- [29] Bushway, R. (1996), *Complementation of direct-injection high-performance liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay for the*

- analysis of thiabendazole in fruit juices and concentrates*, J. Chromatogr. A, 754, 431-435.
- [30] Rodríguez, R., Picó, Y., Font, G., Mañes, J. (2002), *Analysis of thiabendazole and procymidone in fruits and vegetables by capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 949, 359-366.
- [31] Anastassiades, M., Schwack, W. (1998), *Analysis of carbendazim, benomyl, thiophanate methyl and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in fruits and vegetables after supercritical fluid extraction*, J. Chromatogr. A, 825, 45-54.
- [32] Balizs, G. (1999), *Determination of benzimidazole residues using liquid chromatography and tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 727, 167-177.
- [33] Tharsis, N., Portillo, J.L., Broto-Puig, F., Comellas, L. (1997), *Simplified reversed-phase conditions for the determination of benzimidazole fungicides in fruits by high-performance liquid chromatography with UV detection*, J. Chromatogr. A, 78, 95-101.
- [34] Levine, R., Luchtefeld, R., Hopper, M., Salmon, G. (1998), *Automated method for cleanup and determination of benomyl and thiabendazole in table-ready foods*, J. AOAC Int., 81 (6), 1217-1223.
- [35] Di Muccio, A., Ventriglia, C., Attard Barbini, D., Mauro, M., Pelosi, P., Generali, T., Ausili, A., Girolimetti, S. (1995), *Simplified clean-up for the determination of benzimidazolic fungicides by high-performance liquid chromatography with UV detection*, J. Chromatogr. A, 697, 145-152.
- [36] Di Muccio, A., Girolimetti, S., Attard Barbini, D., Pelosi, P., Generali, T., Vergori, L., De Merulis, G., Leonelli, A., Stefanelli, P. (1999), *Selective clean-up applicable to aqueous acetone extracts for the determination of carbendazim and thiabendazole in fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography with UV detection*, J. Chromatogr. A, 833, 61-65.
- [37] Sannino, A. (1995), *Investigation into contamination of processed fruit products by carbendazim, methyl thiophanate and thiabendazole*, Food Chem., 52, 57-61.

- [38] Bernal, J., del Nozal, M., Toribio, L., Jimenez, J., Atienza, J. (1997), *High-performance liquid chromatographic determination of benomyl and carbendazim residues in apiarian samples*, J. Chromatogr. A, 787, 129-136.
- [39] Bushway, R., Hurst. H., Kugabalasooriar, J., Perkins, L. (1991), *Determination of carbendazim in blueberries by reversed-phase high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr., 587, 321-324.
- [40] Young, M., Early, M., Mallet, C., Krol, J. (2001), *Application of a mixed-mode solid-phase extraction and cleanup procedure for LC/MS determination of thiabendazole and carbendazim in apple juice*, J. AOAC Int., 84 (5), 1608-1613.
- [41] Fernández-Alba, A., Tejedor, A., Agüera, A., Contreras, M., Garrido, J. (2000), *Determination of imidacloprid and benzimidazole residues in fruits and vegetables by liquid chromatography-mass spectrometry after ethyl acetate Multiresidue extraction*, J. AOAC Int., 83 (3), 748-755.
- [42] Lacassie, E., Dreyfuss, M., Daguet, J., Vignaud, M., Marquet, P., Lachâtre, G. (1999), *Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry Multiresidue determination of pesticides in apples and pears*, J. Chromatogr. A, 830, 135-143.
- [43] De Ruyck, H., Daeseleire, E., De Ridder, H., Van Renterghem, R. (2002), *Development and validation of a liquid chromatographic-electrospray tandem mass spectrometric multiresidue method for anthelmintics in milk*, J. Chromatogr. A, 976, 181-194.
- [44] Blasco, C., Fernández, M., Picó, Y., Font, G., Mañes, J. (2002), *Simultaneous determination of imidacloprid, carbendazim, methiocarb and hexythiazox in peaches and nectarines by liquid chromatography-mass spectrometry*, Anal. Chim. Acta, 461, 109-116.
- [45] Pous, X., Ruíz, M.J., Picó, Y., Font, G. (2001), *Determination of imidacloprid, metalaxyl, myclobutanil, protham, and thiabendazole in fruits and vegetables by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry*, Fresenius J. Anal. Chem., 371, 182-189.
- [46] Perret, D., Gentili, A., Marchese, S., Sergi, M., D'Ascenzo, G. (2002), *Validation of a method for the determination of multiclass pesticide residues in*

- fruit juices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after extraction by matrix solid-phase dispersion*, J. AOAC Int., 85 (3), 724-730.
- [47] Fernández, M., Rodríguez, R., Picó, Y., Mañes, J. (2001), *Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of post-harvest fungicides in citrus fruits*, J. Chromatogr. A, 912, 301-310.
- [48] Hiemstra, M., Joosten, J., de Kok, A. (1995), *Fully automated solid-phase extraction cleanup and on-line liquid chromatographic determination of benzimidazole fungicides in fruits and vegetables*, J. AOAC Int., 78 (5), 1267-1274.
- [49] Blasco, C., Font, G., Picó, Y. (2002), *Comparison of microextraction procedures to determine pesticides in oranges by liquid chromatography-mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 970, 201-212.
- [50] Yamazaki, Y., Ninomiya, T. (1999), *Determination of benomyl, diphenyl, o-phenylphenol, thiabendazole, chlorpyrifos, methidathion and methyl parathion in oranges by solid-phase extraction, liquid chromatography, and gas chromatography*, J. AOAC Int., 82 (6), 1474-1478.
- [51] Maštovská, K., Lehotay, S., Hajšlová, J. (2001), *Optimization and evaluation of low-pressure gas chromatography-mass spectrometry for the fast analysis of multiple pesticide residues in a food commodity*, J. Chromatogr. A, 926, 291-308.
- [52] Wu, Y.S., Lee, H.K., Li, S.F.Y. (2001), *High-performance chiral separation of fourteen triazole fungicides by sulphated β -cyclodextrin-mediated capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A, 912, 171-179.
- [53] Watanabe, E., Yoshimura, Y., Yuasa, Y., Nakazawa, H. (2001), *Immunoaffinity column clean-up for the determination of imazalil in citrus fruits*, Anal. Chim. Acta, 933, 199-206.
- [54] Watanabe, E., Watanabe, S., Ito, S., Hayashi, M., Watanabe, T., Yuasa, Y., Nakazawa, H. (2000), *Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the fungicide imazalil in citrus fruits*, J. Agric. Food Chem., 48, 5124-5130.
- [55] Matsumoto, H. (2001), *Simultaneous determination of imazalil and its major metabolite in citrus fruit by solid-phase extraction and capillary gas*

- chromatography with electron capture detection*, J. AOAC Int., 84 (2), 546-550.
- [56] King, J., Latham, G., Spalding, D. (1988), *An analytical method for residues of imazalil in tomatoes and bell peppers after postharvest application and storage*, J. Agric. Food Chem., 36 (3), 520-523.
- [57] Kocourek, V., Hajšlová, J., Holadová, K., Pouska, J. (1998), *Stability of pesticides in plant extracts used as calibrants in the gas chromatographic analysis of residues*, J. Chromatogr. A, 800, 297-304.
- [58] Niessner, G., Buchberger, W., Eckerstorfer, R. (1999), *Multiresidue screening methods for the determination of pesticides in plant materials*, J. Chromatogr. A, 846, 341-348.
- [59] Viana, E., Moltó, J.C., Font, G. (1996), *Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the analysis of pesticide residue in vegetables*, J. Chromatogr. A, 754, 437-444.
- [60] Yamazaki, Y., Ninomiya, T. (1996), *Determination of imazalil residues in lemons by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection*, J. AOAC Int., 79 (3), 787-790.
- [61] Garrido, J., de Alba, M., Jiménez, I., Casado, E., Folgueiras, M.L. (1997), *Chromatographic analysis of imazalil and carbendazim in fruits. Method validation and residue monitoring program 1995*, J. Chromatogr. A, 765, 91-97.
- [62] López, M.L., Riba, M. (1999), *Residue levels of ethoxyquin, imazalil and iprodione in pears under cold-storage conditions*, J. Agric. Food Chem., 47 (8), 3228-3236.
- [63] Cabras, P., Angioni, A., Garau, V., Pirisi, F., Brandolini, V., Cabitza, F., Cubbedu, M. (1998), *Pesticide residues in prune processing*, J. Agric. Food Chem., 46 (9), 372-374.
- [64] Stahly, E.A., Buchanan, D.A. (1986), *Extraction, purification and quantitation of paclobutrazol from fruit tree tissues*, HortSci., 21 (3), 534.

- [65] Navickiene, S., Ribeiro, M.L. (1999), *Rapid method for the determination of thiabendazole and imazalil residues in orange by capillary column gas chromatography*, J. High Resol. Chromatogr., 22 (5), 303-304.
- [66] Fernández, M., Picó, Y., Mañes, J. (2001), *Comparison of gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry for the residue analysis of pesticides in oranges*, Chromatographia, 54 (5-6), 302-308.
- [67] Zambonin, C., Cilenti, A., Palmisano, F. (2002), *Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the rapid screening of triazole residues in wine and strawberries*, J. Chromatogr. A, 967, 255-260.
- [68] Garland, S., Menary, R., Davies, N. (1999), *Dissipation of propiconazole and tebuconazole in peppermint crops and their residues in distilled oils*, J. Agric. Food Chem., 47 (1), 294-298.
- [69] Torres, C.M., Picó, Y., Mañes, J. (1997), *Comparison of octadecylsilica and graphitized carbon black as materials for solid-phase extraction of fungicide and insecticide residues from fruit and vegetables*, J. Chromatogr. A, 778, 127-137.
- [70] Kawasaki, M., Fukuhara, K., Katsumura, R., Takasaka, N., Uchiyama, S. (1997), *GC/MS (SIM) determination of 14 pesticides including cyhexatin and 2,4,5-T in Nuts*, J. Food Hyg. Soc. Japan, 38 (3), 161-169.
- [71] Ito, Y., Ikai, Y., Oka, H., Hayakawa, J., Kagami, T. (1998), *Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis. Simultaneous determination of thiabendazole and imazalil in citrus fruit and banana using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*, J. Chromatogr. A, 810, 81-87.
- [72] Mauk, C.S., Unrath, C.R., Blankenship, S.M. (1990), *Rapid quantitative analysis of a gibberellin-sterol inhibitor (paclobutrazol) using high-performance liquid chromatographic cartridge columns*, J. Plant Growth Regul., 9 (3), 181.
- [73] Mauk, C.S., Unrath, C.R., Blankenship, S.M. (1990), *Development of a strong exchange method for purification and HPLC, assay of gibberellin-sterol inhibitors in plant tissue*, J. Chromatogr. Sci., 28 (12), 621.

- [74] Obana, H., Akusu, K., Okihashi, M., Hori, S. (2001), *Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits using two-layered column with graphitized carbon and water absorbent polymer*, *Analyst*, 126 (9), 1529-1534.
- [75] Bicchi, C., Cordero, C., Rubiolo, P., Occelli, A. (2001), *Simultaneous determination of six triazolic pesticide residues in apple and pear pulps by liquid chromatography with ultraviolet diode array detection*, *J. AOAC Int.*, 84 (5), 1543.
- [76] Yamazaki, Y., Ninomiya, T. (1998), *Determination of bitertanol residues in strawberries by liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by gas chromatography/mass spectrometry*, *J. AOAC Int.*, 81 (6), 1252-1256.
- [77] Kaihara, A., Yoshii, K., Tsumara, Y., Ishimitsu, S., Tonogai, Y. (2002), *Multiresidue analysis of 18 pesticides in fresh fruits, vegetables, and rice by supercritical-fluid extraction and liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry*, *J. Health Sci.*, 48 (2), 173-178.
- [78] Columé, A., Cárdenas, S., Gallego, M., Valcárcel, M. (2000), *Simplified method for the determination of chlorinated fungicides and insecticides in fruits by gas chromatography*, *J. Chromatogr. A*, 882, 193-203.
- [79] Valverde-García, A., González, E., Martínez, J., Agüera, A. (1991), *Simple and efficient multiresidue screening method for analysis of nine halogen-containing pesticides on peppers and cucumbers by GLC-ECD*, *J. Agric. Food Chem.*, 39 (12), 2188-2191.
- [80] Valverde-García, A., González, E., Aguilera, A., Ureña, M. (1993), *Determination and degradation study of chlorothalonil residues in cucumbers, peppers and cherry tomatoes*, *Anal. Chim. Acta*, 276 15-23.
- [81] Zhao, L., Fan, D-F. (1996), *Gas chromatographic determination of chlorothalonil in leaves and roots of scrophularia and in soil*, *J AOAC Int.*, 79 (2), 587-588.
- [82] Krol, W., Arsenault, T., Pylypiw, H., Incorvia, M.J. (2000), *Reduction of pesticide residues on produce by rinsing*, *J. Agric Food Chem.*, 48, 4666-4670.

- [83] Jiménez, J., Bernal, J., del Nozal, M., Toribio, L., Mayorga, A. (2001), *Use of deactivated fused-silica capillary precolumns in pesticide analysis by gas chromatography with electron-capture detection*, J. Chromatogr. A, 919, 373-379.
- [84] Valverde-García, A., Fernández-Alba, AR., Contreras, M., Agüera, A. (1996), *Supercritical-fluid extraction of pesticides from vegetables using anhydrous magnesium sulfate for sample preparation*, J. Agric. Food Chem., 44 (7), 1780-1784.
- [85] Lee, S., Papathakis, M., Feng, H-M. C., Hunter, G., Carr, J. (1991), *Multipesticide residue method for fruits and vegetables: California Department of Food and Agriculture*, Fresenius J., Anal. Chem., 339, 376-383.
- [86] Soleas, G., Yan, J., Hom, K., Goldberg, D. (2000), *Multiresidue analysis of seventeen pesticides in wine by gas chromatography with mass-selective detection*, J. Chromatogr. A, 882, 205-212.
- [87] Martínez, J., Arrebola, F., Mateu-Sánchez, M. (2002), *Application of gas chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of pesticides in fruits and vegetables*, J. Chromatogr. A, 959, 203-213.
- [88] Martínez, J., Arrebola, F., Mateu-Sánchez, M. (2002), *Application to routine analysis of a method to determine multiclass pesticide residues in fresh vegetables by gas chromatography/tandem mass spectrometry*, Rapid Commun. Mass Spectrom., 16, 1106-1115.
- [89] Arrebola, F., Martínez, J., González-Rodríguez, M., Garrido-Frenich, A., Sánchez, N. (2003), *Reduction of analysis time in gas chromatography-tandem mass spectrometry to the determination of pesticide residues in vegetables*, J. Chromatogr. A, 1005, 131-141.
- [90] Hernando, M.D., Agüera, A., Fernández-Alba, A., Piedra, L., Contreras, M. (2001), *Gas chromatographic determination of pesticides in vegetable samples by sequential positive and negative chemical ionisation and tandem mass spectrometric fragmentation using an ion trap analyser*, Analyst, 126, 46-51.
- [91] Blasco, C., Font, G., Mañes, J., Picó, Y. (2003), *Solid-phase microextraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry to determine postharvest fungicides in fruits*, Anal. Chem., 75, 3606-3615.

- [92] Blasco, C., Picó, Y., Mañes, J., Font, G. (2002), *Determination of fungicide residues in fruits and vegetables by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 947, 227-235.
- [93] Saad, B., Hana, N., Idiris, M., Asan, N., Abu, A., Ali, N. (2004), *Determination of ortho-phenylphenol, diphenyl and diphenylamine in apples and oranges using HPLC with fluorescence detection*, Food Chem., 84, 313-317.
- [94] Motohashi, N., Nagashima, H., Meyer, R. (1991), *High-performance liquid chromatography of fungicides in citrus fruits*, J. Liq. Chromatogr., 14 (19), 3591-3602.
- [95] Johnson, G., Harsy, S., Gerónimo, J., Wise, J. (2001), *Orthophenylphenol and phenylhydroquinone residues in citrus fruit and processed citrus products after postharvest fungicides treatments with sodium orthophenylphenate in California and Florida*, J. Agric. Food Chem., 49, 2497-2502.
- [96] Yu, L., Schoen, R., Dunkin, A., Firman, M., Cushman, H., Fontanilla, A. (1997), *Determination of o-phenylphenol, diphenylamine, and propargite pesticide residues in selected fruits and vegetables by gas chromatography-mass spectrometry*, J. AOAC Int., 80 (3), 651-656.
- [97] Rodríguez, R., Mañes, J., Picó, Y. (2003), *Off-line solid-phase microextraction and capillary electrophoresis mass spectrometry to determine acidic pesticides in fruits*, Anal. Chem., 75 (3) 452-459.
- [98] Ito, Y., Goto, T., Oka, H., Matsumoto, H., Miyazaki, Y., Takahashi, N., Nakazawa, H. (2003), *Simple and rapid determination of thiabendazole, imazalil and o-phenylphenol in citrus fruit using flow-injection electrospray ionisation tandem mass spectrometry*, J. Agric. Food Chem., 51, 861-866.

2

MÉTODOS MULTIRESIDUALES PARA
LA DETERMINACIÓN DE FUNGICIDAS

2.1. INTRODUCCIÓN

Considerando el tratamiento intenso a base de fungicidas que se aplica en el cultivo de bananas para control de enfermedades típicas ocasionadas por hongos, como es el caso de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijensis*), así como el tratamiento post-cosecha al que son sometidos los cítricos, uno de los primeros objetivos de este trabajo de investigación ha sido el desarrollo de una metodología de análisis multiresidual para la determinación de fungicidas seleccionados en este tipo de frutas de alto consumo.

Una serie de fungicidas, tanto de acción sistémica, como es el caso de propiconazol, bitertanol, clorotalonil y dicloran, como fungicidas post-cosecha, como carbendazima (benomilo), tiabendazol e imazalil, han sido seleccionados de acuerdo a la frecuencia de utilización en el cultivo de bananas. Además, se ha pretendido la aplicación de la metodología desarrollada a muestras de naranjas, teniendo en cuenta que tanto naranjas como bananas se someten a un tratamiento post-cosecha similar, principalmente con fungicidas como carbendazima e imazalil.

El o-fenilfenol es también un fungicida post-cosecha, y uno de los compuestos más utilizados durante el transporte y almacenamiento de cítricos, motivo por el cual se ha considerado su inclusión en el presente estudio.

Los residuos de plaguicidas se pueden determinar por métodos de análisis individuales o por métodos multiresiduales. Bien conocido es que los métodos individuales supondrían mucho tiempo para la determinación de varios plaguicidas, por lo cual son menos empleados, aunque pueden ser utilizados selectivamente cuando se tiene información del uso inadecuado de un cierto plaguicida. También son de uso obligado cuando las características físico-químicas del plaguicida requiere la utilización de métodos específicos para su correcta determinación. En general, se prefiere el uso de métodos de análisis multiresiduales por razones de economía y tiempo.

De hecho, debido al gran número de plaguicidas actualmente en uso, hoy en día en los laboratorios que se dedican al control seriado de residuos en

alimentos se suelen utilizar métodos multiresiduales, entre los que destacan los propuestos por la *Association Oficial of Analytical Chemistry (AOAC)*, *National Food Administration* de Suecia, los Métodos Oficiales de Análisis de Holanda, los Métodos Oficiales para el Análisis de Residuos de Pesticidas de Alemania (DFG) o los propuestos por la EPA de Estados Unidos [1]

En este sentido, numerosos métodos multiresiduales han sido propuestos para la determinación desde unos pocos plaguicidas hasta decenas de ellos, presentes en muestras vegetales, mediante técnicas cromatográficas con sistemas de detección sensibles y selectivos. Entre otras, las técnicas de análisis más utilizadas para la determinación de distintos fungicidas han sido la cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS) y la cromatografía líquida (LC) con detección por fluorescencia (FD) o barrido de diodos (DAD).

La mayoría de estos métodos suelen incluir una etapa de extracción con disolventes orgánicos, seguida de la purificación del extracto antes de su análisis cromatográfico. La extracción con disolventes orgánicos es una de las técnicas de tratamiento de muestra más ampliamente utilizada para la determinación de plaguicidas debido a su simplicidad puesto que no requiere ningún tipo de instrumentación compleja. Una de las variables más importantes a tener en cuenta en el proceso de extracción es el disolvente orgánico utilizado como extractante. En la selección de éste se han de considerar aspectos como su polaridad, volatilidad y compatibilidad con las técnicas analíticas de medida.

Los extractos obtenidos son usualmente sometidos a diferentes procedimientos de purificación antes de su análisis cromatográfico, dependiendo de la matriz y de los analitos, así como del método cromatográfico que se utilice. La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica ampliamente usada con fines de purificación (clean-up), que permite la limpieza y concentración de analitos en distintas matrices. Su aplicación mejora y simplifica las separaciones, prolonga la vida útil de la columna cromatográfica y mejora los límites de detección.

Con respecto al etapa de extracción, la *General Inspectorate for Health Protection* del Ministerio de Salud Pública de Holanda, en su manual de *Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuff* [2] describe dos

alternativas para muestras no grasas, dentro de una guía para la aplicación de métodos residuales para distintos tipos de muestras en la cual se incluye la determinación de algunos de los compuestos objeto de estudio. Una de las alternativas consiste en el uso de acetato de etilo para la extracción de los analitos mediante homogenización de la muestra con sulfato de sodio, mientras que una segunda opción es la extracción con acetona seguida de una partición líquido-líquido con otros disolventes orgánicos (diclorometano y éter de petróleo). El método con acetato de etilo tiene mayor alcance que el método con acetona para la extracción de compuestos polares. En lo que concierne a la selectividad, el procedimiento de extracción con acetona puede ser más favorable que la extracción con acetato de etilo en presencia de sulfato de sodio porque, en general, la cantidad de compuestos polares co-extraídos de la matriz será menor.

La bibliografía consultada hace referencia a la extracción de residuos de fungicidas bencimidazólicos en frutas y vegetales con acetona, seguido de la adición de diclorometano y éter de petróleo [3] y [4]. Para el desarrollo de un método multiresidual que permita la determinación de los fungicidas seleccionados, hemos tomado como base el método de extracción propuesto por Hiemstra *et al.* [4], el cual propone la extracción de fungicidas bencimidazólicos mediante la adición de acetona seguida de una partición líquido-líquido con diclorometano y éter de petróleo. El extracto obtenido, después de su concentración y redisolución en metanol, es purificado en un sistema automatizado mediante SPE con cartuchos diol. La elución de los analitos se realiza con una disolución metanol-ácido fosfórico (1:1) antes de su determinación por LC-DAD/FD.

Además, se ha considerado la adición de acetato de etilo como extractante, por su mayor capacidad para la extracción de compuestos de un amplio rango de polaridad, lo que permitiría su aplicación en la recuperación de diversos plaguicidas que pueden ser indistintamente analizados por cromatografía líquida o por cromatografía de gases. De esta manera, sería posible la aplicación de un método de extracción para la recuperación no sólo de fungicidas benzimidazoles (carbendazima, tiabendazol), sino también fungicidas azólicos (bitertanol, imazalil, propiconazol) y otros considerados como derivados aromáticos (o-fenilfenol), entre otros (clorotalonil, dicloran) [5].

El método multiresidual desarrollado en esta Memoria propone la purificación de los extractos utilizando dos alternativas mediante SPE, dependiendo de los analitos y de la técnica analítica utilizada. La determinación de fungicidas mediante LC ha supuesto la purificación de los extractos a través cartuchos diol, mientras que la determinación de fungicidas por GC ha conllevado la etapa de purificación de los extractos mediante el uso de cartuchos de Florisil.

Ambas fases de purificación (diol y Florisil) han sido ampliamente probadas por varios autores, especialmente en el caso de Florisil, que se ha aplicado a diversas matrices ambientales, biológicas y vegetales [6-12], para la determinación de una variedad de plaguicidas, incluyendo organoclorados, organofosforados, piretroides y otros. La fase diol por su parte, también ha sido aplicada principalmente en la purificación de extractos vegetales [13-14].

Si bien el método de *Hiemstra et al.* [4] aplica un sistema de purificación automatizado (ASPEC), nosotros hemos hecho uso de condiciones convencionales para la aplicación de la etapa de purificación mediante SPE, considerando que uno de los objetivos de la investigación planteada ha sido el desarrollo de metodología analítica asequible para su implementación en centros de investigación con recursos e infraestructura básica.

A este respecto, Ecuador es un país joven en materia de investigación de residuos de plaguicidas en alimentos, por lo que el desarrollo y el empleo de métodos analíticos que permitan el tratamiento sencillo de la muestra e instrumentación menos sofisticada es fundamental para el avance de este campo científico.

Cabe indicar, además, que el control de residuos de plaguicidas se ha hecho muy exigente durante los últimos años, lo cual ha sido posible gracias al aumento de la sensibilidad de los métodos analíticos utilizados para su determinación. Por ello, en el presente estudio se pretende alcanzar niveles de detección próximos o por debajo de los límites máximos de residuos establecidos por las diferentes legislaciones internacionales (ver Tabla 1.2). Para ello, se han desarrollado dos métodos multiresiduales basados en el uso de GC-MS y de LC-DAD/FD. Los dos métodos desarrollados se han aplicado a muestras de naranja y de banana.

La determinación cromatográfica de los fungicidas seleccionados mediante los dos métodos desarrollados ha permitido la comparación de ventajas y desventajas, así como la comparación de resultados de concentración obtenidos en las muestras reales analizadas.

2.2. DETERMINACIÓN DE FUNGICIDAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECTOR DE BARRIDO DE DIODOS Y DE FLUORESCENCIA (LC-DAD/FD)

Para la realización del estudio de fungicidas por cromatografía líquida (LC) fueron seleccionados en primera instancia una serie de compuestos de interés por su frecuente aplicación en bananas y/o en naranjas: benomilo, carbendazima, tiofanato de metilo, tiabendazol, bitertanol, o-fenilfenol, tridemorf e imazalil.

Sin embargo, después del estudio espectrofotométrico para seleccionar las longitudes de onda óptimas para la detección de los distintos compuestos, se decidió excluir del estudio el tridemorf, por no presentar absorbancia, así como el imazalil, ya que absorbe en una zona común (~200 nm) para muchos otros compuestos lo cual resta selectividad a su determinación. Por su parte, benomilo y carbendazima presentan un mismo espectro de absorción característico. Aunque el tiofanato de metilo presentó un comportamiento espectral específico, tanto este compuesto como el benomilo pueden degradarse durante los procesos preparativos de la muestra, o incluso antes, dando lugar a la formación de carbendazima. Por estas razones, tiofanato de metilo y benomilo fueron también excluidos como compuestos objetos de estudio.

De esta manera, el desarrollo de un método multiresidual mediante extracción con disolvente, purificación por extracción en fase sólida (SPE) y determinación analítica mediante cromatografía líquida con detección por Barrido de Diodos (DAD) y de Fluorescencia (FD) se centra en la determinación de carbendazima, tiabendazol, o-fenilfenol y bitertanol, habiéndose optimizado cada una de las etapas.

Como punto de partida para la optimización del método en muestras de naranja y banana, se tomó un procedimiento de extracción con acetona y una mezcla de disolventes, diclorometano-éter de petróleo (1:1), descrito en la bibliografía [4]. La adición de acetato de etilo en la extracción favoreció la

recuperación de todos los analitos, permitiendo la obtención de un método de extracción para la recuperación de compuestos de amplia polaridad.

Una vez extraídas las muestras, los extractos obtenidos se purificaron mediante SPE en cartuchos de fase diol. La elución de los analitos fue posible con una mezcla metanol-ácido fosfórico 0.1 M (1:1), después de acondicionar los cartuchos con la misma mezcla de elución.

La optimización del método se realizó considerando las etapas de extracción y purificación de manera independiente. Las experiencias de optimización fueron llevadas a cabo, en primer lugar, con disoluciones patrón y, posteriormente, en extractos de naranja y de banana fortificados, antes de la validación del método, que se realizó a tres niveles de concentración comprendidos en el rango de valores ensayado para la linealidad de cada fungicida.

La técnica de fluorescencia es preferida para la determinación cuantitativa de los fungicidas puesto que proporciona mayor selectividad que DAD. Sin embargo, los espectros de absorción obtenidos mediante DAD aportan la información necesaria para confirmar la detección de estos compuestos.

Finalmente, el método optimizado fue aplicado a muestras reales de naranja y banana usando detector de fluorescencia para la cuantificación y confirmando la identidad de los plaguicidas mediante comparación de los espectros de los compuestos obtenidos por DAD. La aplicación de otras técnicas como LC-LC/FD, LC-MS/MS y GC-MS no ha sido considerada en el presente capítulo, pero ha formado parte de otros trabajos, tal y como se detalla en los respectivos capítulos de esta Tesis.

2.2.1. Experimental

Patrones

Los patrones sólidos de carbendazima (MBC), o-fenilfenol (OPP) de concentración 97% de pureza, así como tiabendazole (TBZ) y bitertanol de 99% de pureza fueron suministrados por Dr. Ehrenstorfer (Promochem, Wesel, Alemania).

Disoluciones stock de concentración aproximada $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ se prepararon por pesada. 20 mg de cada compuesto fueron disueltos en 50 mL de acetonitrilo, excepto tiabendazol (metanol) y carbendazima (acetona). Las disoluciones se almacenaron en congelador a -18°C . A partir de estas disoluciones individuales se prepararon las mezclas de patrones (soluciones de trabajo) por dilución en metanol y en agua HPLC, almacenándose en frigorífico a 4°C .

Disolventes y Reactivos

Los disolventes orgánicos utilizados (diclorometano, éter de petróleo, acetato de etilo, cloroformo, metil ter butil éter) fueron de calidad análisis de ultratrazas, mientras que la acetona y hexano fueron calidad para análisis de residuos de plaguicidas. El metanol y acetonitrilo fueron de calidad HPLC. Todos los disolventes fueron suministrados por Scharlab (Barcelona, España). El agua utilizada fue de calidad HPLC, obtenida mediante un sistema desionizador Barnstead Nanopure II.

Los reactivos, como el acetato de amonio para preparación de la solución acuosa de la fase móvil, el hidróxido de sodio para preparación de la solución de neutralización de pH del extracto de muestra, y el ácido fosfórico para preparación de la solución de elución, fueron de calidad para análisis y suministrados por Panreac (Barcelona, España).

Material

El material de vidrio utilizado durante la realización del estudio consistió básicamente en vasos de precipitados, tubos graduados de 15 mL provistos de tapón de vidrio esmerilado, pipetas Pasteur y probetas graduadas. El material volumétrico utilizado, pipetas y matraces aforados, fue de tipo A

Para medición del volumen de la solución neutralizadora de hidróxido de sodio se utilizó pipeta automática de 20-200 μL (Mettler Toledo).

La extracción en fase sólida (SPE) se realizó de forma manual con cartuchos de 3 mL con relleno de 500 mg de *Bond-Elut diol* de Varian (Sharlab,

Barcelona, España) y de *Supelclean™ LC-Sílica SPE Tubes* de Supelco (Sigma-Aldrich, Madrid), mediante un dispositivo para preparación de muestras por SPE de Varian (Harbor City, California, USA), equipados con bomba de vacío.

Los extractos finales de muestra que presentaban pequeñas partículas en suspensión fueron filtrados a través de membranas de nylon Osmonics de 0.45 μm , proporcionados por Scharlab, previo al proceso de inyección para una introducción segura del extracto en el sistema cromatográfico.

Otros aparatos, como la trituradora K55E (Dito Sama, Francia), agitador Ultraturrax T25 (Janke and Kunkel, Alemania), bloque calefactor Multiblock (Selecta), fueron utilizados durante la preparación y procesamiento de las muestras.

Muestras

Las muestras blanco (bananas y naranjas) utilizadas para la optimización y validación del método fueron obtenidas de una cooperativa de productos agrícolas ecológicos, comprobándose la no presencia de fungicidas. Estas muestras blanco, de un peso equivalente a 2 Kg, fueron trituradas, almacenadas en tarrinas independientes de aproximadamente 100 g, y guardadas en congelador a -18°C hasta su utilización.

La mayoría de las muestras reales de bananas fueron adquiridas en supermercados locales siendo de distintas procedencias; 3 muestras más fueron obtenidas en Ecuador, dos de ellas directamente de una bananera, habiendo sido una de las mismas tratada con fungicidas post-cosecha, mientras que la tercera fue adquirida en supermercado.

Las muestras reales de naranjas fueron, en su mayoría, adquiridas en supermercados y tiendas de verduras locales, siendo de distinta procedencia. Dos muestras se obtuvieron directamente de una cooperativa productora y comercializadora de cítricos. En las Tablas 2.1 y 2.2 se indican la identificación y características de las muestras de naranja y de bananas utilizadas en este estudio.

Las muestras reales fueron trituradas inmediatamente después de su recepción en el laboratorio y almacenadas en congelador a -18°C hasta su análisis.

Tabla 2.1. Identificación y características de muestras reales de naranjas utilizadas para la aplicación de los métodos de análisis desarrollados.

<i>Muestra</i>	<i>Variedad</i>	<i>Lugar de adquisición</i>	<i>Origen</i>
Naranja 1	Valencia Late	Supermercado	Desconocido
Naranja 2	Valencia Late	Supermercado	Desconocido
Naranja 3	Valencia Late	Supermercado	España
Naranja 4	Valencia Late	Supermercado	España
Naranja 5	Valencia Late	Cooperativa de cítricos	Uruguay
Naranja 6	Valencia Late	Supermercado	España
Naranja 7	Navel	Supermercado	Desconocido
Naranja 8	Valencia Late	Supermercado	Sud-Africa
Naranja 9	Navel	Tienda de verduras	España
Naranja 10	Valencia Late	Supermercado	Uruguay
Naranja 11	Valencia Late	Supermercado	Desconocido
Naranja 12	Valencia Late	Tienda de verduras	Desconocido
Naranja 13	Mandarina	Cooperativa de cítricos	España

Tabla 2.2. Identificación y características de muestras reales de bananas utilizadas para la aplicación de los métodos de análisis desarrollados.

<i>Muestra</i>	<i>Variedad</i>	<i>Lugar de adquisición</i>	<i>Origen</i>
Banana 1	Cavendish	Bananera	Ecuador
Banana 2	Cavendish	Bananera	Ecuador
Banana 3	Cavendish	Supermercado	Ecuador
Banana 4	Desconocida	Tienda de verduras	Francia
Banana 5	Plátano de Canarias	Tienda de verduras	España
Banana 6	Cavendish	Supermercado	Panamá
Banana 7	Cavendish	Supermercado	Costa Rica
Banana 8	Desconocida	Supermercado	Francia
Banana 9	Desconocida	Supermercado	Desconocido

Fortificación

La fortificación de muestras de naranja y bananas para validación del método se realizó a los niveles de concentración indicados en la Tabla 2.3, en la cual se indica también los volúmenes y la concentración de las disoluciones patrón utilizadas para la fortificación. Así, 10 g de muestra fueron fortificados mediante la adición de una disolución en metanol de mezcla de patrones de una concentración y volumen indicados en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Fortificación de las muestras blanco para la validación del método

	Concentración en muestra (MBC, TBZ, OPP, Bitertanol) (mg.Kg ⁻¹)	Fortificación	
		Volumen (mL)	Concentración disolución patrón (µg.mL ⁻¹)
<i>Naranja</i>	8, 6.4, 3.2, 1.6	1	80, 64, 32, 16
	4, 3.2, 1.6, 0.8	0.5	80, 64, 32, 16
	0.5, 0.6 ⁽¹⁾	0.5	10, 12
	0.1, 0.05 ⁽²⁾	0.03	40, 16
<i>Banana</i>	4, 3.2, 1.6, 0.8	0.5	80, 64, 32, 16
	2, 1.6, 0.8, 0.4	0.5	40, 32, 16, 8
	0.2, 0.16, 0.1, 0.05	0.05	40, 32, 20, 8

⁽¹⁾ MBC, TBZ⁽²⁾ OPP, Bitertanol

Equipos Instrumentales

Las determinaciones cromatográficas se llevaron a cabo en un sistema de cromatografía líquida equipado con una bomba ternaria Varian 9012 (Walnut Creek, USA), una bomba de baja presión Gilson Modelo 402 (Villiers-le-Bel, France), inyector automático de Gilson con dos puertos de 6 válvulas Rheodyne, con *loop* para la inyección de 100 µL y provisto de teclado Gilson.

Los sistemas de detección consistieron en un detector de Barrido de Diodos HP 1100 series y de un detector de Fluorescencia HP 1046A, ambos de Hewlett-Packard (Waldbronn, Alemania).

Las columnas cromatográficas fueron Kromasil del tipo C₁₈ de dos longitudes: 250 x 4.6 mm d.i. y diámetro de partícula 5 µm para bananas, y 120 x 4 mm d.i. y diámetro de partícula 5 µm para naranjas.

La obtención de cromatogramas y medición cuantitativa de áreas máximas de pico se realizó con el programa HP Chem Station para LC 3D System (versión del software A.05.03).

2.2.2. Resultados y discusión

Optimización de Condiciones Cromatográficas

Como ya se ha indicado anteriormente, en un principio estaba previsto el estudio de benomilo y tiofanato de metilo, que son precursores de la carbendazima. Es conocido que estos dos compuestos pueden ser fácilmente convertidos a carbendazima, lo cual depende en gran medida del pH y de las condiciones de extracción [15, 16, 17]. Aunque la determinación de moléculas intactas de benomilo y tiofanato de metilo ha sido reportada por Lacassie et al. [18] y Bernal et al.[19], respectivamente, ambas experiencias revelan que la extracción con disolventes orgánicos no proporcionó resultados satisfactorios, ya que al parecer se producía una hidrólisis parcial a carbendazima bajo las condiciones de operación propuestas [20].

Por ello, habiendo demostrado mediante inyección directa de disoluciones de patrón individuales que tanto carbendazima como benomilo presentan un mismo espectro de absorción (debido a la presencia de carbendazima formada en la disolución patrón de benomilo), y teniendo en cuenta que los límites máximos de residuos establecen la cuantificación de carbendazima como la suma de benomilo, tiofanato de metilo y carbendazima, se descartó el estudio de los dos precursores benzimidazólicos.

Finalmente, con los cuatro fungicidas seleccionados (carbendazima, tiabendazol, o-fenilfenol y bitertanol), se procedió a la optimización de las condiciones cromatográficas.

Selección de las Longitudes de Onda

Inicialmente, se realizó el estudio de las longitudes de emisión y excitación por fluorescencia, mediante la inyección de disoluciones individuales

patrón. Los analitos, una vez llegan a la celda del detector, son retenidos en la misma, siendo posible la monitorización de las longitudes de onda a las cuales se produce la mayor excitación y emisión de señal de cada compuesto.

A modo de ejemplo, se muestra en la Figura 2.1 los espectros de carbendazima, tiabendazol, o-fenilfenol y bitertanol, obtenidos mediante inyección de disoluciones patrón de $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ disueltos en agua HPLC. Así mismo, también se realizó la selección de las longitudes de onda más adecuadas para la detección por DAD a partir de las longitudes de onda de absorción de los espectros obtenidos para cada compuesto. En la Tabla 2.4 se anotan las longitudes de onda seleccionadas para la detección de los compuestos, tanto por DAD como por FD.

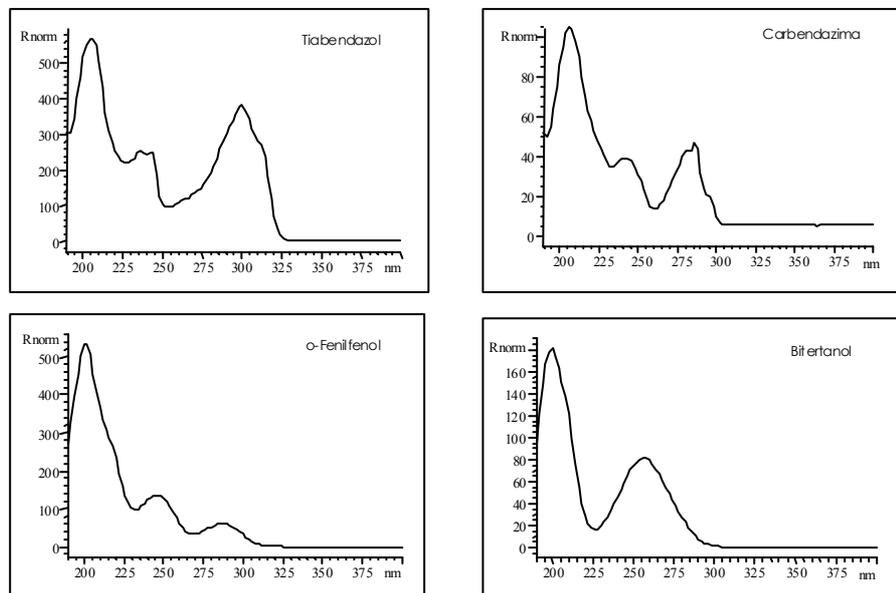


Figura 2.1. Espectros de absorción de disoluciones patrón de $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de concentración de carbendazima, tiabendazol, o-fenilfenol y bitertanol.

Tabla 2.4. Longitudes de onda seleccionadas para su estudio por LC-DAD/FD

Fungicidas	DAD		FD
	λ (nm)	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)
MBC	286	241	312
TBZ	300	227	355
OPP	246	257	343

Bitertanol	257	244	329
------------	-----	-----	-----

Selección de la Fase Móvil

En cromatografía líquida, la fase móvil es una de las variables cromatográficas más importantes. Normalmente, en cromatografía en fase inversa se utilizan mezclas de agua y un disolvente orgánico soluble en ella, al que se denomina modificador orgánico. Los más utilizados en la práctica son metanol y acetonitrilo, siendo este último el que se utilizó debido a su mayor fuerza eluotrópica.

Se ha utilizado una columna Kromasil C₁₈, cuyas ventajas para este tipo de compuestos han sido reportadas por Tharsis *et al.* [3], indicando que no es necesaria la adición de ningún compuesto amino a la fase móvil para minimizar la interacción entre los átomos de nitrógeno de los analitos en estudio y los grupos residuales ácidos del silanol de la fase estacionaria. Sin embargo, otros autores [21] indican que el tiabendazol suele dar un pico bastante ancho debido a este tipo de interacción, aún en el caso de utilizarse una sal de amonio para la mejora de su resolución. En este estudio, el tiabendazol presentó una forma de pico con pequeña cola, pero ello no afectó la resolución entre los analitos ni significó dificultades para la cuantificación de los mismos.

En mezclas complejas con compuestos con distinta polaridad, la elución en condiciones isocráticas no siempre permite obtener una adecuada resolución en un tiempo razonable de análisis. Así, en primer lugar se ha estudiado el comportamiento cromatográfico de los fungicidas seleccionados evaluándose varios gradientes (acetonitrilo-agua). Un alto contenido de agua al inicio del gradiente favorece el incremento del tiempo de retención de los compuestos menos retenidos, mientras que el posterior aumento del contenido orgánico del gradiente permite la elución rápida de los compuestos más retenidos.

El pH de la fase móvil es otra de las variables que afectan a la resolución de los analitos en LC [4, 22-23]. Se ha estudiado la resolución para los fungicidas seleccionados utilizando diferentes tampones para la fase acuosa: fosfato ácido de potasio 5 mM a pH 4.0 y 7.0, y acetato de amonio 10 mM a pH 7.0.

Se comprobó (Figura 2.2) que la resolución cromatográfica de los analitos en medio ácido no fue satisfactoria, mientras que en medio neutro los resultados fueron buenos. Finalmente, se prefirió el uso del tampón de acetato de amonio, ya que su uso evitaba posibles problemas de precipitación en el sistema cromatográfico.

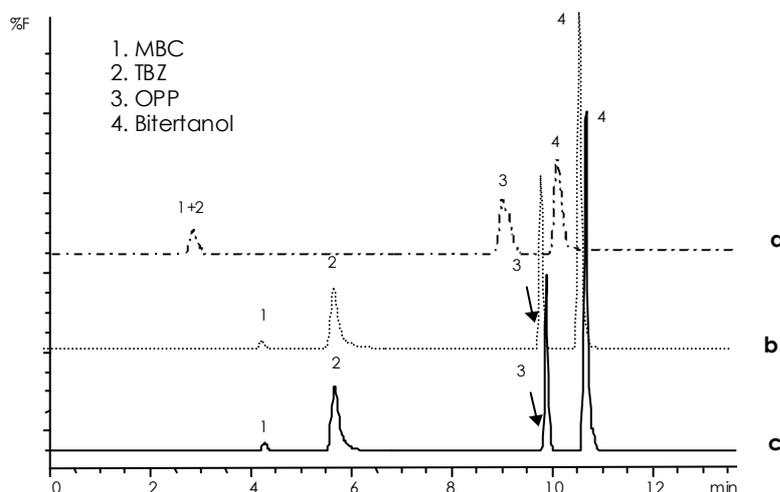


Figura 2.2. Cromatograma LC-FD de una disolución de mezcla de fungicidas de 400 ng·mL⁻¹, utilizando como fase móvil gradiente de acetonitrilo y solución tampón (acuoso) de 5 mM KH₂PO₄ a pH 4.0 (a), 5 mM KH₂PO₄ a pH 7.0 (b) y 10 mM CH₃COONH₄ a pH 7.0 (c). Volumen de inyección: 100 μL, flujo: 1 mL·min⁻¹.

A lo largo del estudio se han utilizado dos columnas Kromasil C₁₈ de diferente tamaño, de modo que el gradiente óptimo para cada una de ellas es diferente. En la Tabla 2.5 se indican las condiciones seleccionadas.

Tabla 2.5. Gradiente seleccionado como fase móvil para la determinación cromatográfica de los fungicidas seleccionados en columnas de Kromasil C₁₈, 120 mm y 250 mm de longitud.

<i>t</i> (min)	120 mm		<i>T</i> (min)	250 mm	
	H ₂ O ⁽¹⁾ (%)	CH ₃ CN (%)		H ₂ O ⁽¹⁾ (%)	CH ₃ CN (%)
0.00	75	25	0.00	70	30
3.50	75	25	9.00	70	30
9.00	30	70	11.00	30	70

11.00	30	70	20.00	30	70
11.01	75	25	20.01	70	30
16.00	75	25	28.00	70	30

⁽¹⁾ 0.01 M CH₃COONH₄ (%)

La Figura 2.3 muestra un cromatograma de una disolución patrón de los fungicidas seleccionados a un nivel de concentración de 200 ng·mL⁻¹ obtenido con las condiciones cromatográficas definitivas.

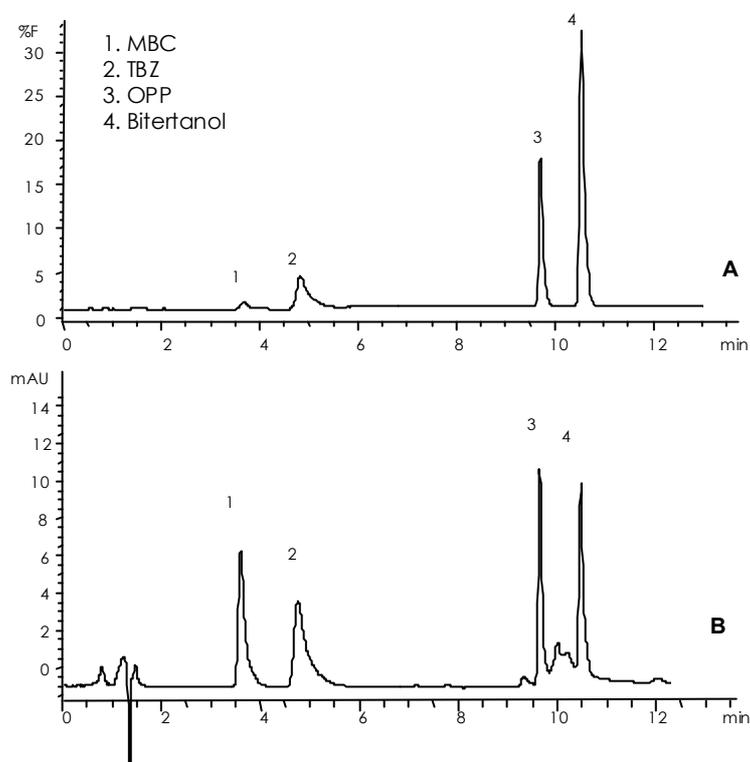


Figura 2.3. Cromatograma LC correspondiente a una disolución patrón de 200 ng·mL⁻¹ de los fungicidas seleccionados, con las condiciones cromatográficas optimizadas. Detección mediante FD (A) y DAD (B).

Carbendazima y tiabendazol son detectados con mayor sensibilidad mediante DAD, mientras que o-fenilenol y bitertanol son mucho más sensibles al detector por fluorescencia. Si bien el estudio propone el uso de DAD y FD

como sistemas de detección, conforme se fueron desarrollando las pruebas de optimización del método con extractos de muestra, se obtuvieron cromatogramas más limpios para todos los compuestos cuando la detección se realizó por FD, por lo cual se escogió este detector para la cuantificación de los mismos, mientras que la detección por DAD permite la confirmación de los analitos.

Características Analíticas

La determinación de las características analíticas para la determinación cromatográfica de los fungicidas seleccionados se llevó a cabo mediante inyección directa de disoluciones patrón en agua y detección por fluorescencia. En primer lugar, se realizó el estudio de la repetibilidad de la respuesta analítica ($n=7$) a tres niveles de concentración (10, 100 y 1000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), en un mismo día. Los valores de desviación estándar obtenidos fueron siempre inferiores al 10% (Tabla 2.6), excepto para tiabendazol al nivel más bajo de concentración. Adicionalmente, se realizó el estudio de precisión intermedia entre días de la señal, mediante inyección de las disoluciones de patrón ($n=9$) en tres días distintos en una misma semana con resultados igualmente satisfactorios ($\text{RSD} < 10\%$) (Tabla 2.6).

Tabla 2.6. Repetibilidad y precisión intermedia del método cromatográfico LC-FD

Fungicidas	Repetibilidad (RSD%)			Precisión Intermedia (RSD%)		
	10	100 ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	1000	10	100 ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	1000
MBC	5	3	1	5	6	2
TBZ	13	4	-	13	7	8
OPP	5	1	1	2	2	1
Bitertanol	8	5	1	6	7	2

La linealidad de la respuesta cromatográfica se estudió para intervalos de concentración diferentes en cada caso, en función de su sensibilidad, incluyendo como mínimo un número de 5 puntos en la curva de calibrado. En la Tabla 2.7 se muestran los intervalos de concentración para los que se han obtenido respuesta lineal para cada uno de los compuestos ($R > 0.99$), así como

las ecuaciones correspondientes. En la Figura 2.4 se muestran las curvas de calibrado obtenidas.

En la Tabla 2.7 se indican también los límites de detección (LOD) instrumentales para cada compuesto definidos como la concentración correspondiente a una relación señal/ruido de 3 en el cromatograma de menor concentración.

Tabla 2.7. Linealidad y límites de detección mediante inyección directa de disoluciones patrón en el sistema LC-FD

Fungicidas	Rango de concentración ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	R	Ecuación	LOD ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
MBC	10-6400	0.9951	$y=0.0398x+4.4922$	2.5
TBZ	5-2000	0.9997	$y=0.5261x-8.7921$	1.5
OPP	1-1000	0.9990	$y=0.4933x+2.6988$	0.5
Bitertanol	1-1000	0.9952	$y=0.8201x+14.944$	0.2

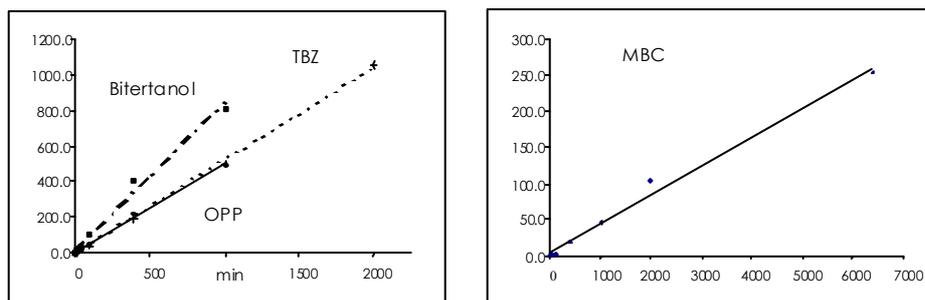


Figura 2.4. Curvas de calibrado correspondientes a los fungicidas seleccionados obtenidas mediante LC-FD

Estudio de las Etapas de Extracción y Purificación

Una vez seleccionadas las condiciones cromatográficas para la separación y cuantificación de los fungicidas seleccionados, se procedió al estudio de la etapa de extracción y purificación de la muestra. Se tomaron como condiciones iniciales del estudio las propuestas por Hiemstra *et al.* [4] en su método para la

determinación de compuestos bencimidazólicos en muestras de naranjas mediante LC.

La preparación de muestras de acuerdo con estas condiciones consiste en una etapa de extracción con acetona seguida de una partición con diclorometano-éter de petróleo para la recuperación de los analitos dentro de la fase orgánica. La purificación del extracto se realizó en cartuchos diol y elución de los analitos con una mezcla de metanol-0.1 M de ácido fosfórico (1:1), a partir de 3 mL de extracto, disuelto en metanol e introducido en un sistema automatizado de SPE (ASPEC), antes de su análisis mediante LC-DAD.

El estudio de las etapas de extracción y purificación se llevó a cabo de manera separada, evaluando en primer lugar el comportamiento de los analitos frente al proceso de purificación por SPE con disoluciones patrón.

Las variables estudiadas durante la etapa de purificación consistieron en:

- Optimización de la retención: tipo de sorbente (cartuchos de sílica y diol), disolvente que contiene el extracto, disolvente de lavado, acondicionamiento del cartucho.
- Optimización de la elución: volumen y disolvente de elución.

El procedimiento general de trabajo para la purificación mediante SPE de los extractos vegetales fue el siguiente:

- Acondicionamiento de la fase estacionaria con 2 mL de cada disolvente utilizado durante la carga del extracto, lavado y disolvente de elución.
- Carga del extracto de muestra en el cartucho.
- Lavado del cartucho con 1 mL de varios disolventes estudiados.
- Secado de la fase estacionaria durante 15 ó 30 minutos.
- Elución de los fungicidas ensayando varias mezclas de elución en volúmenes de 2 a 3 mL.

En primer lugar, se realizaron pruebas preliminares con cartuchos de fase sílica de 0.5 g, utilizando disoluciones patrón de 400 ng·mL⁻¹ en metanol y en hexano, y como disolvente de elución 2 mL de la mezcla metanol-0.1 M ácido fosfórico (1:1). De acuerdo con los resultados obtenidos, se descartó la

utilización de metanol para realizar la carga del extracto y el lavado del cartucho, ya que se producían pérdidas por la elución de los analitos durante el lavado. Por otro lado, el lavado con hexano no afectaba la retención de los analitos en el cartucho, aunque las recuperaciones de los compuestos no fueron completamente satisfactorias, en especial para carbendazima (50%), aún cuando se utilizó adicionalmente 2 mL de acetona para mejorar la elución.

Habiéndose comprobado así que la recuperación de los analitos no era favorable en todos los casos, se realizó un estudio más exhaustivo con cartuchos diol para la optimización de la etapa de purificación.

Cartuchos Diol

La fase diol se caracteriza porque la estructura silano-diol está enlazada covalentemente a la superficie de una partícula de sílice, permitiendo la extracción de analitos polares y moderadamente polares contenidos en muestras no acuosas. Aunque con un apropiado acondicionamiento el cartucho se puede utilizar también como sorbente no polar para extraer moléculas relativamente no polares de muestras acuosas, es más frecuente su uso para extraer moléculas polares de disolventes relativamente no polares utilizando las interacciones por enlaces de hidrógeno.

En esta parte del estudio se hace hincapié en la evaluación de tres parámetros críticos: el disolvente utilizado para cargar el extracto como factor incidente en la retención de los analitos, el disolvente de lavado y el disolvente de elución.

Las primeras experiencias en cartuchos diol se realizaron con disoluciones patrón de $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ en metanol y en hexano, introducidas directamente en el cartucho. La tendencia de los resultados fue la misma que la observada en cartuchos de sílica, evidenciándose pérdidas de los analitos durante la carga del extracto en metanol, y la obtención de recuperaciones no satisfactorias cuando se utiliza como mezcla de elución 2 mL acetona y 2 mL de metanol-0.5 M ácido fosfórico (1:1).

Es importante resaltar que para conseguir la retención de los analitos en el cartucho no es posible la carga del extracto en un disolvente polar como el

metanol. Ello obligó a realizar un cambio de disolvente después de la extracción, para lo cual se estudió el comportamiento de los fungicidas frente a una serie de disolventes durante la carga del extracto y lavado del cartucho.

Las pruebas se realizaron con disoluciones patrón de 200 ng·mL⁻¹, que fueron concentradas mediante evaporación con un flujo de nitrógeno y calentamiento a 40°C. Los disolventes estudiados fueron: cloroformo, hexano-cloroformo (50:50, 70:30, 75:25), metil ter-butil éter, hexano-metil ter butil éter (50:50, 75:25), diclorometano, hexano-diclorometano (50:50, 70:30, 75:25). En todos los casos la elución se realizó con 2 mL de metanol-0.1 M ácido fosfórico (1:1).

Tabla 2.8. Recuperación (%) de patrones de fungicidas (200 ng·mL⁻¹) en distintos disolventes, purificados mediante SPE con cartuchos de fase diol. Elución con 2 mL metanol-0.1M H₃PO₄ (1:1)

Carga	Acondic.	Lavado	Elución	Recuperación (%)			
				MBC	TBZ	OPP	BIT
Cloroformo	Cloroformo	Cloroformo	MeOH-H ₃ PO ₄	92	105	(a)	107
Hx-Cl ₃ CH (50:50)	Hexano Cloroformo	Hexano	MeOH-H ₃ PO ₄	89	76	21 (a)	116
Hx-Cl ₃ CH (70:30)	Hexano Cloroformo	Hexano	MeOH-H ₃ PO ₄	91	71	52 (a)	112
Hx-Cl ₃ CH (75:25)	Hexano Cloroformo	Hexano	MeOH-H ₃ PO ₄	85	59	63 (a)	121
MTBE	MTBE	MTBE	MeOH-H ₃ PO ₄	86	107	8 (a)	90
Hx-MTBE (50:50)	Hexano MTBE	Hexano	MeOH-H ₃ PO ₄	98	95	22 (a)	132
Hx-DCM (50:50)	Hexano DCM	Hexano	MeOH-H ₃ PO ₄	77	91	32 (a)	107
Hx-DCM (75:25)	Hexano DCM	Hexano	MeOH-H ₃ PO ₄	86	81	68 (a)	126

^(a) Elución de OPP durante carga del extracto

De acuerdo con los datos recogidos en la Tabla 2.8 el compuesto más problemático resulta ser el o-fenilfenol, para el que se obtuvieron bajas recuperaciones en todos los casos y, en menor medida, el tiabendazol. Los mejores resultados se obtuvieron con la disolución hexano-diclorometano (75:25), que permitió la recuperación de todos los fungicidas satisfactoriamente

a excepción del o-fenilfenol (68%). La adición de diclorometano favorecía la retención de casi todos los analitos en el cartucho, a excepción del o-fenilfenol, mientras que la adición de hexano mejoraba la retención de este compuesto.

Ya que la fase diol puede presentar interacciones tanto polares como no polares dependiendo de la preparación del cartucho, se evaluó también la etapa de retención en cartuchos acondicionados con el mismo disolvente de elución, metanol-H₃PO₄ 0.1M (1:1). De acuerdo con Hiemstra *et al.*[4] se produce una interacción polar mediante enlaces de hidrógeno entre la fase diol y los átomos de nitrógeno de los compuestos, lo cual favorece la retención de los analitos.

Tabla 2.9. Recuperación (%) de patrones de fungicidas (200 ng·mL⁻¹) sometidos al proceso de purificación mediante SPE en cartuchos de fase diol acondicionados con el disolvente de elución metanol-0.1M H₃PO₄ (1:1)

Carga	Acondic.	Lavado	Elución	Recuperación (RSD%)			
				MBC	TBZ	OPP	BIT
Metanol	MeOH-H ₃ PO ₄	Metanol	MeOH-H ₃ PO ₄	97	100	(a)	(a)
	MeOH						
Hx-DCM (70:30)	MeOH-H ₃ PO ₄ MeOH Hexano DCM	Hexano	MeOH-H ₃ PO ₄	93	100	55 (a)	114
Hx-DCM (75:25)	MeOH-H ₃ PO ₄ MeOH Hexano DCM	Hexano	MeOH-H ₃ PO ₄			65 (a)	100

^(a) Elución de OPP durante la carga del extracto

En la Tabla 2.9 se observa que el acondicionamiento previo del cartucho con el disolvente de elución permitió la retención de los compuestos bencimidazólicos. La carga del extracto disuelto en metanol produjo la pérdida de o-fenilfenol y bitertanol, puesto que fueron eluidos en este paso de la etapa de purificación, mientras que la disolución hexano-diclorometano para cargar el extracto permitió la retención de todos los compuestos y su posterior elución satisfactoriamente. Los resultados para o-fenilfenol fueron tan sólo del orden del 55%, debido principalmente a la pérdida parcial del compuesto (25–35%) durante la carga del extracto (Figura 2.5).

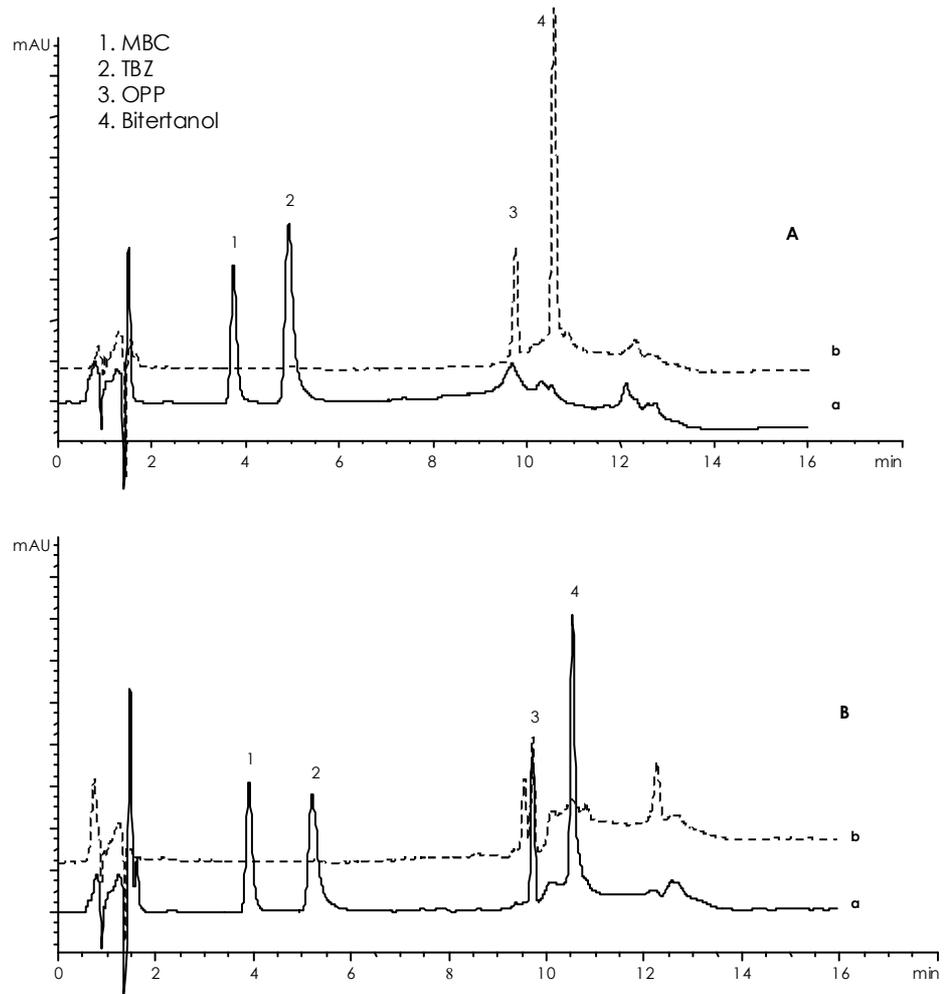


Figura 2.5. Cromatograma LC-DAD correspondiente a una mezcla de patrones de $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ después de purificación en cartuchos de fase diol. (A) en metanol y (B) patrones disueltos en hexano-diclorometano (70:30). En ambos casos, la figura (a) corresponde a la elución con 2 mL de una disolución metanol-0.1 M H_3PO_4 (1:1) y la figura (b) al eluato durante la carga del extracto.

Cabe indicar que el proceso de evaporación (tal y como se comentará posteriormente durante el estudio de la etapa de extracción), resulta bastante crítico para la recuperación de o-fenilfenol, ya que se trata de un compuesto relativamente volátil. Esto justifica el comportamiento irregular de este analito observado en los cartuchos diol, reflejado en la poca repetibilidad de los resultados obtenidos, con valores de desviación estándar relativa del 40% (Tabla 2.10).

Tabla 2.10. Recuperación (%) y desviación estándar relativa en patrones de 200 ng·mL⁻¹, purificados mediante SPE con cartuchos diol (500 mg) de acuerdo a las condiciones de purificación optimizadas.

Fungicidas	R (%)			RSD (%)
	(1)	(2)	(3)	
Carbendazima	93	92	93	0.4
Tiabendazol	99	99	101	2
o-Fenilfenol	68	30	67	40
Bitertanol	116	116	110	3

De esta manera, se seleccionan como condiciones definitivas para la purificación de los extractos de naranja y banana las descritas en el esquema de la Figura 2.6, debiéndose prestar especial atención a la etapa previa de evaporación/concentración de los extractos por ser crítica para o-fenilfenol.

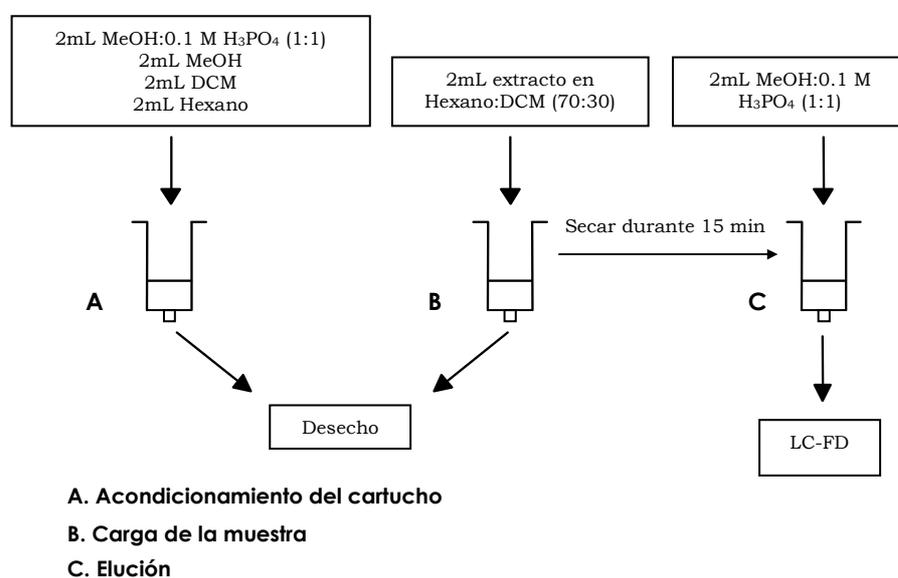


Figura 2.6. Esquema del procedimiento recomendado para la purificación de extractos de naranja y banana en cartuchos diol de 500 mg.

Todos los extractos eluidos durante las pruebas en cartuchos diol han sido neutralizados (a pH 7) con la adición de 50 µL 0.1 M de hidróxido de sodio antes de su inyección en el sistema cromatográfico. La neutralización del extracto ácido favorece la resolución cromatográfica de tiabendazol en la

columna analítica. Antes de su inyección en el sistema cromatográfico, las disoluciones finales obtenidas fueron llevadas a un volumen final de 2 mL con agua HPLC.

Una vez estudiado el comportamiento de los analitos en el proceso de SPE, se procedió al estudio de la etapa de extracción de los analitos de la muestra. El método que se pretende desarrollar incluye un proceso de concentración de una alícuota de extracto, previa a la purificación del mismo, y posiblemente un cambio de disolvente para hacerlo compatible con los cartuchos diol utilizados en la purificación.

Dependiendo de las presiones de vapor de los diferentes compuestos investigados, la etapa de evaporación puede ser una etapa crítica en la metodología de análisis, ya que se pueden producir pérdidas de los analitos más volátiles, lo que significaría la imprecisión y falta de exactitud en los resultados [24].

Por ello, se evaluó la etapa de evaporación del extracto, para lo cual se fortificaron 50 mL de la mezcla de disolvente usada para la extracción (20 mL de acetona y 30 mL de diclorometano-éter de petróleo (1:1)) a un nivel de 500 ng·mL⁻¹ con una disolución patrón acuosa de fungicidas. Diferentes alícuotas de 10 mL de este extracto se sometieron al proceso de evaporación calentando a 40°C y bajo corriente de nitrógeno, llevándose a sequedad. Los extractos fueron redisolueltos tanto en acetonitrilo como en metanol.

Adicionalmente se realizaron experiencias llevando a cabo el cambio de disolvente a acetonitrilo y metanol sin llevar a sequedad. Las experiencias realizadas permitieron concluir que la fase de evaporación es crítica para la recuperación de los analitos, puesto que se producen pequeñas pérdidas, siendo el más problemático de los compuestos el o-fenilfenol. Por ello, se estableció que en el proceso de evaporación no se debe llevar a sequedad el extracto, sino evaporar de manera controlada hasta aproximadamente 0.5 mL y llevar a cabo el cambio de disolvente utilizando acetonitrilo.

De acuerdo con las condiciones de extracción propuestas en la bibliografía [4], y una vez controladas las condiciones de evaporación del extracto, se procedió a la evaluación del comportamiento de los fungicidas en matriz de muestra. En este caso, a partir de 15 mL de extracto blanco de

muestra de naranjas, fortificado a $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, se comprobó que la detección por fluorescencia proporcionaba cromatogramas más limpios que por DAD, observándose en este segundo caso interferentes que co-eluyen con los analitos en estudio (Figura 2.7).

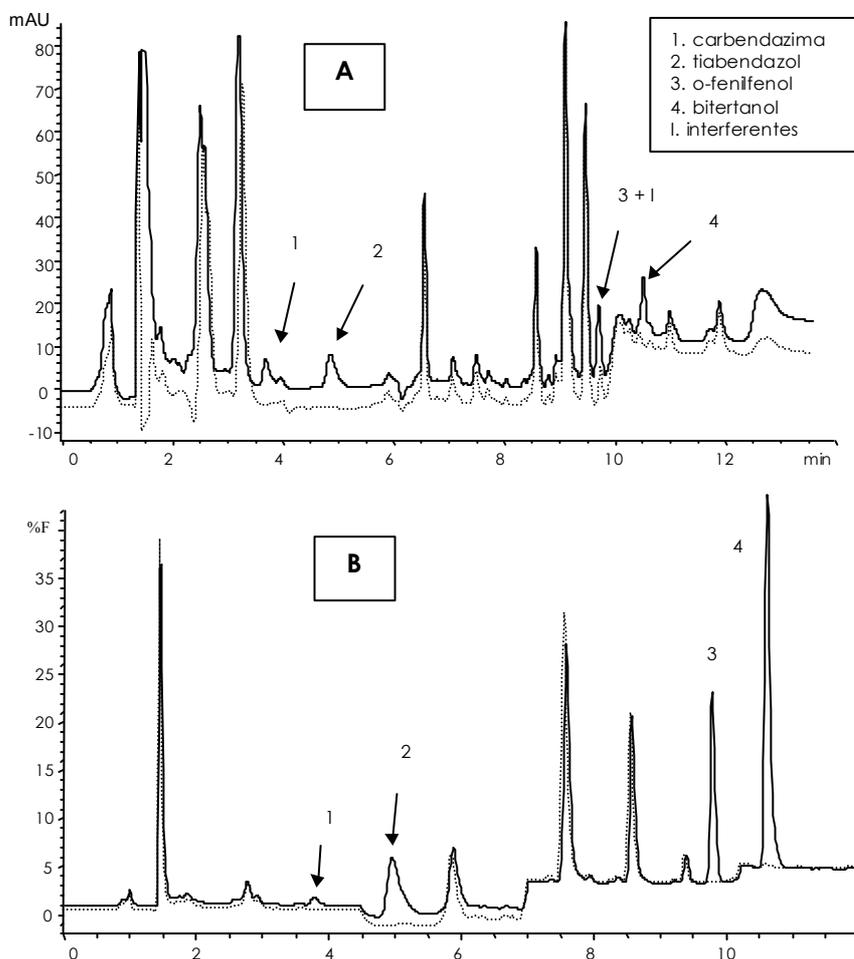


Figura 2.7. Cromatogramas LC correspondientes a un extracto de naranja fortificado a $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ con los fungicidas seleccionados comparado con su respectivo blanco: (A) DAD y (B) FD.

Se pudo confirmar, mediante los espectros obtenidos por DAD, que en el caso de o-fenilfenol el pico que eluye al mismo tiempo que este compuesto corresponde efectivamente a un interferente, ya que los espectros no coincidieron (Figura 2.8).

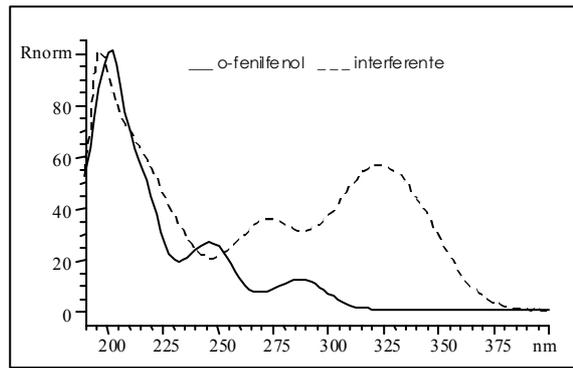


Figura 2.8. Comparación del espectro de absorción de un interferente presente en una muestra blanco de naranja co-eluido junto con o-fenilfenol, obtenido mediante detección por DAD frente al respectivo patrón.

Estos interferentes no resultaron ser significativos a niveles altos de concentración en muestra, pero sí podían dificultar la cuantificación de los picos de los analitos cuando se trataba de bajos niveles. Este hecho también se observó para carbendazima y tiabendazol. En la Figura 2.9 se puede apreciar la presencia de estos interferentes en un extracto de naranja fortificado a $20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ contrastado con el respectivo blanco, mediante su detección por FD.

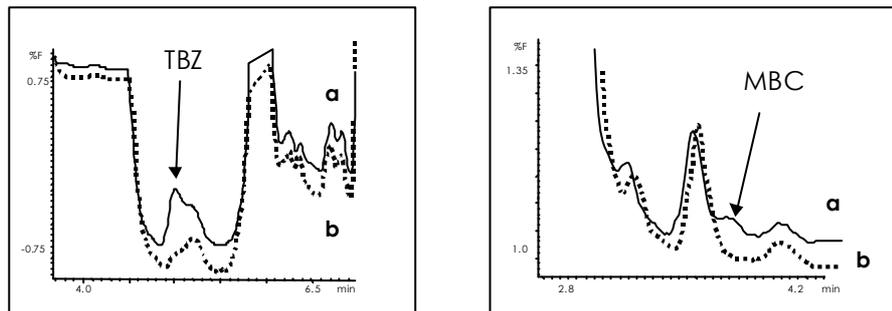


Figura 2.9. Cromatogramas LC-DAD correspondientes a un extracto de naranja fortificado a un nivel de $20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ con los fungicidas seleccionados. a) interferentes que co-eluyen junto a MBC y TBZ, respectivamente. b) extracto blanco

El método de extracción propuesto en la bibliografía [4] y las condiciones de SPE seleccionadas fueron aplicadas a muestras de naranja fortificadas a nivel de $1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, comprobándose que el método proporcionaba recuperaciones aceptables para los compuestos benzimidazólicos (60-70%) y bitertanol (80%),

pero no era así para el caso de o-fenilfenol (30%), cuya baja recuperación no debía ser consecuencia exclusiva de las posibles pérdidas por evaporación. Por esta razón, con la finalidad de mejorar las recuperaciones de los analitos, se desarrollaron algunas experiencias con muestras fortificadas, a modo de pruebas preliminares para la optimización de la etapa de extracción.

Se probaron distintos procedimientos de agitación manual y, finalmente, se optó por la extracción con Ultraturrax a alta velocidad. Se realizaron experiencias de extracción con acetona y acetato de etilo mediante homogenización con Ultraturrax durante 3 minutos, después de la adición de 30 mL de disolventes. También se evaluó la extracción con 3 tipos de mezclas de disolventes: 20 mL de acetona y 40 mL de diclorometano-éter de petróleo (1:1) seguidos de la adición acetonitrilo, metanol o acetato de etilo.

De los resultados obtenidos, cabe indicar que la extracción con acetona o acetato de etilo era adecuada para los fungicidas bencimidazólicos, pero no ocurría lo mismo con o-fenilfenol y bitertanol, que no eran completamente recuperados (Tabla 2.11).

Tabla 2.11. Recuperación (%) de fungicidas a partir de muestras blanco de naranja fortificadas usando diferentes disolventes de extracción

<i>Fungicidas</i>	<i>Acetona</i>	<i>Acetato de etilo</i>	<i>Acetona + DCM-éter de petróleo + Acetato de etilo</i>
Carbendazima	87	106	106
Tiabendazol	89	100	93
o-Fenilfenol	34	11	82
Bitertanol	50	16	98

Las combinaciones de acetonitrilo y metanol presentaron inconvenientes debido a problemas de miscibilidad entre los disolventes y a la presencia del contenido acuoso de la fruta, provocando periodos de evaporación más largos que resultaban críticos para la recuperación, principalmente de o-fenilfenol. Además, se pudo observar durante el análisis cromatográfico una exagerada elevación de la línea de base provocando que los picos de interés se vieran saturados mediante detección con fluorescencia e imposibles de cuantificar.

La adición de acetato de etilo como extractante ha sido también evaluada en otros trabajos de investigación [2, 25] para la determinación de o-fenilfenol y bitertanol. En este caso, se confirmó que el empleo de la mezcla acetona, diclorometano-éter de petróleo, seguida de la adición de acetato de etilo aseguraba la recuperación de carbendazima, tiabendazol, o-fenilfenol y bitertanol de manera satisfactoria.

Durante las experiencias con adición de acetato de etilo, se pudo observar que era importante conseguir el equilibrio entre la porción grasa (piel de naranja) y la porción acuosa para evitar el enturbiamiento del extracto. Por ello, se ensayó la posibilidad de disolver el residuo final únicamente en metanol y no en agua HPLC para proceder a su inyección con 100% de orgánico. Bajo estas condiciones se apreciaron, sin embargo, picos anchos y distorsionados en los cromatogramas. El uso de 50% de orgánico (metanol) condujo a resultados satisfactorios (Figura 2.10). Finalmente, se procedió a la filtración del extracto con un contenido del 50% de orgánico, antes de su inyección en el sistema cromatográfico.

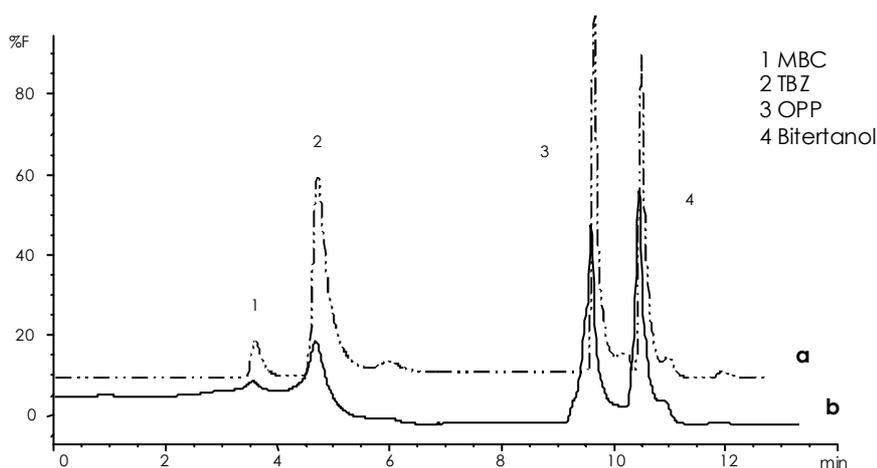


Figura 2.10. Cromatograma LC-FD correspondiente a una disolución patrón inyectada con un 50% (a) y 100% (b) de metanol.

Es importante resaltar que se optó por el uso combinado de estos cuatro disolventes con diferentes polaridades porque podría ser útil para el desarrollo de trabajos futuros enfocados a la determinación de otros fungicidas con

diferente estructuras químicas, con la posibilidad de aplicar cromatografía de gases para su determinación analítica.

Finalmente, considerando la posibilidad de realizar en paralelo la determinación de fungicidas mediante cromatografía gaseosa a partir de un mismo extracto de muestra, se evaluó el efecto de la adición de sulfato de sodio al extracto para la eliminación del contenido de agua propio de la matriz. Las recuperaciones fueron igualmente aceptables cuando se empleó aproximadamente 20 g de sulfato de sodio para secar la muestra, como cuando no se hizo uso del mismo.

Después de la optimización de la etapa de extracción por un lado y del procedimiento de purificación con disoluciones patrón por otro, se procedió al estudio de la etapa de purificación utilizando extractos de naranja y banana fortificados con los fungicidas seleccionados.

Matriz: Naranjas

Se analizaron por LC tanto extractos de muestra fortificados sin ser sometidos al procedimiento de purificación como extractos purificados mediante SPE en cartuchos diol. Los extractos de muestra se obtuvieron a partir de muestras blanco extractadas de acuerdo con las condiciones optimizadas y se fortificaron a nivel equivalente a 3.2, 2.6, 1.6 y 0.6 mg·Kg⁻¹ en el fruto con carbendazima, tiabendazol, o-fenilfenol y bitertanol, respectivamente. 15 mL del extracto ya fortificado fueron concentrados y llevados a 2 mL con hexano-diclorometano (7:3), previamente al proceso de SPE. Por otra parte, los extractos no purificados fueron evaporados y redisoluertos en 2 mL de acetonitrilo-agua antes de su inyección en LC.

Cabe indicar que la purificación en cartuchos diol permite la parcial limpieza de los extractos como puede observarse en la Figura 2.11. Por otra parte, tal y como ya se ha comentado en la optimización de la etapa de extracción, los cromatogramas revelan la presencia de interferentes que co-eluyen junto con la carbendazima y tiabendazol, especialmente en extractos de naranja no purificados, sin conseguirse la total eliminación de ellos a pesar de la operación de limpieza a la que se someten estos extractos vegetales.

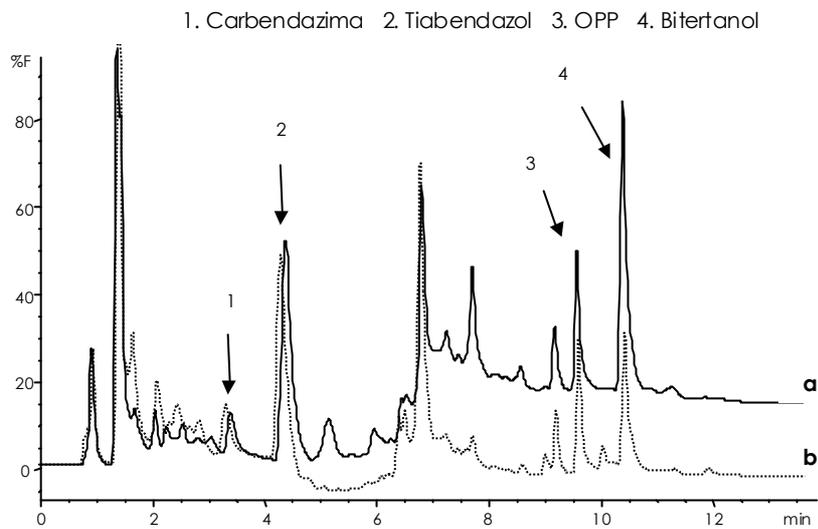


Figura 2.11. Cromatogramas LC-FD correspondientes a un extracto de muestra de naranja fortificada a una concentración equivalente a 3.2, 2.6, 1.6, 0.6 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ sin purificación (a) y con purificación mediante SPE con cartucho diol de 500 mg (b).

Los inconvenientes para la cuantificación de los analitos a niveles bajos de concentración en muestra suscitados por la presencia de estos interferentes, fueron posteriormente resueltos con el empleo de una columna Kromasil C_{18} de mayor longitud (250 mm). Los comentarios al respecto son anotados en el apartado de validación del método junto con la descripción de los valores de recuperación obtenidos en muestras fortificadas y analizadas mediante LC con detección por DAD y fluorescencia.

Matriz: Bananas

Una vez realizada la optimización del método para la determinación de fungicidas en muestras de naranjas, se aplicó el mismo en muestras de bananas. Para ello se inyectó, en primer lugar, un extracto blanco de banana y un extracto fortificado a $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, ambos sin purificar.

Los cromatogramas obtenidos (Figura 2.12) muestran la presencia de ciertos interferentes que co-eluyen con el tiabendazol (pico 2) y bitertanol (pico 4) en el extracto blanco de banana. Al realizar el estudio de los espectros obtenidos mediante detección por DAD entre los picos interferentes y los analitos, se observó que los espectros realmente no coincidían entre sí. Sin embargo, al tratarse de muestras comerciales utilizadas como blancos, era posible suponer que los picos realmente correspondieran a residuos de plaguicidas presentes en las muestras, que al encontrarse en cantidades pequeñas dificultaba la obtención de espectros lo suficientemente definidos. En todo caso, esta situación se solucionó, a efectos de cuantificación de los compuestos, restando el área de los picos interferentes con respecto al área de los fungicidas en estudio. Cabe indicar que para la aplicación posterior del método en muestras reales fue factible la adquisición de bananas que no habían sido tratadas pre ni post-cosecha con productos agroquímicos, pudiendo hacer uso de las mismas como muestra blanco en este estudio.

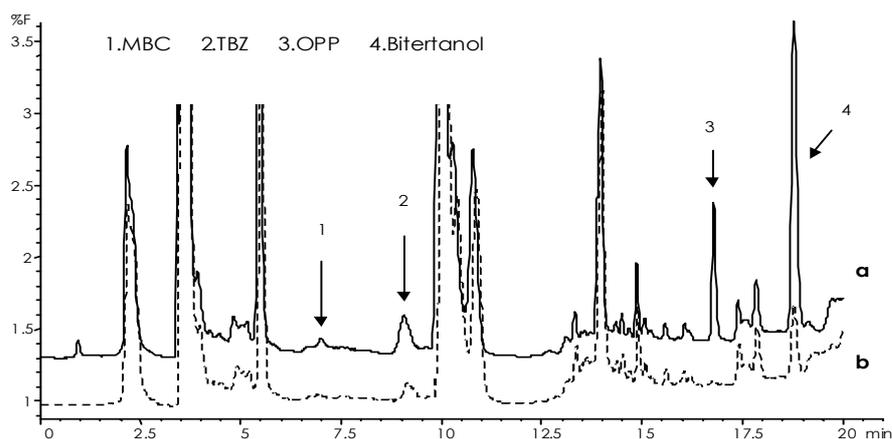


Figura 2.12. Cromatograma LC-FD correspondiente a un extracto blanco de banana fortificado a $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (a) y el extracto blanco sin fortificar (b).

En general, los extractos de banana proporcionan cromatogramas bastante más limpios que los de naranjas. Ello se vio favorecido también por el empleo de una columna analítica de mayor longitud (250 mm) que la utilizada en el caso de naranjas (120 mm), permitiendo una mejor separación de los interferente propios de la matriz.

Se evaluó también la capacidad de purificación de los cartuchos diol en los extractos de muestra, mediante la comparación entre un extracto blanco inyectado sin purificación y otro con purificación por SPE, aplicando las mismas condiciones de extracción y purificación que para naranjas.

De la observación de la Figura 2.13 se puede concluir que la inyección de extractos purificados a través de fase diol permite la obtención de cromatogramas con menos interferentes que los presentes en extractos no purificados.

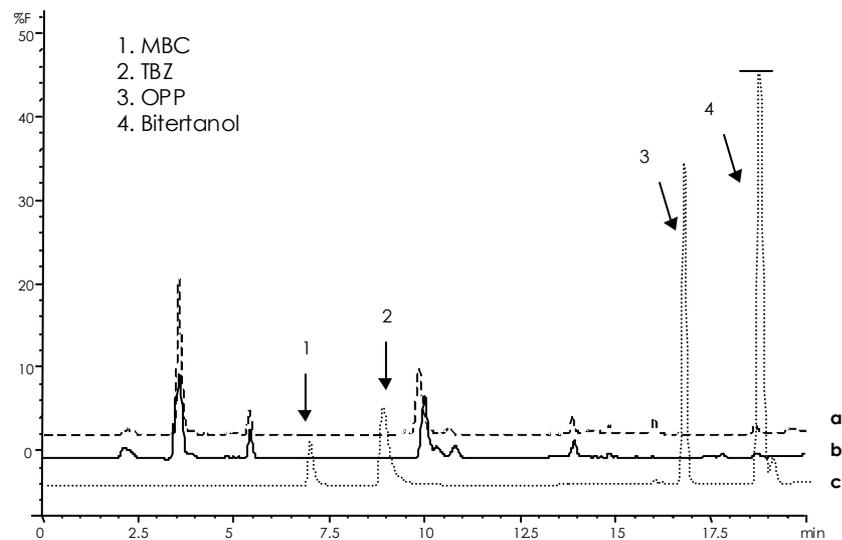


Figura 2.13. Cromatogramas LC-FD correspondientes a un extracto blanco de banana sin purificación (a), y con purificación por SPE con cartuchos de fase diol de 500 mg (b) y a una disolución patrón de MBC ($800 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), TBZ, OPP y Bitertanol ($400 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) (c).

Finalmente, también se trabajó con una muestra blanco de plátano, la cual fue procesada bajo las mismas condiciones aplicadas a bananas, para realizar la comparación entre estas dos matrices pertenecientes a la misma familia vegetal de las *musáceas*. No se encontraron grandes diferencias entre las dos matrices (Figura 2.14), aunque el extracto de plátano se observó más limpio que el de banana. Además, se evidenció la presencia de tiabendazol a bajos niveles puesto que, al igual que en el caso de bananas, la muestra de plátano

utilizada como blanco correspondió a una muestra comercial, obtenida en supermercado.

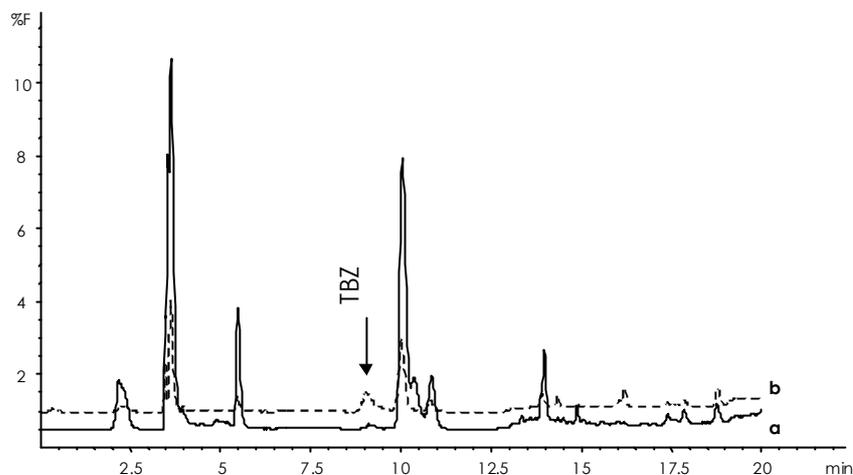


Figura 2.14. Cromatograma LC-FD. Comparación entre extracto blanco de (a) banana y (b) plátano*.

* La muestra usada como blanco contenía bajos niveles de tiabendazol

Los valores de recuperación obtenidos a partir de muestras fortificadas sometidas al procesamiento completo de análisis serán comentados en el apartado de validación del método.

Procedimiento Recomendado

En resumen, el procedimiento recomendado para la determinación de fungicidas seleccionados en muestras de bananas y naranjas es el siguiente:

- 10 g de muestra fresca de naranja o banana triturada (muestra completa con piel) se extraen, en primer lugar, con 20 mL de acetona, 40 mL de una disolución de diclorometano-éter de petróleo (1:1) y, posteriormente con, 40 mL de acetato de etilo en Ultraturax. La mezcla se agita durante un periodo de 3 minutos después de cada adición de disolventes. Seguidamente, el homogenizado es filtrado por gravedad con papel de filtro y recogido en un matraz aforado para su posterior enrase con acetato de etilo a un volumen de 100 mL. Una alícuota de 15 mL de extracto se concentra con calentamiento en un baño de agua a 40°C y con

corriente de nitrógeno hasta 2 mL, se adicionan 2 mL de hexano-diclorometano (70:30) y se continua evaporando hasta 0.5 mL. Finalmente se lleva a 2 mL con adición de una disolución de hexano-diclorometano (70:30).

- Después de la extracción, se procede a la purificación del extracto mediante SPE en cartucho diol. Los cartuchos son acondicionados haciendo pasar a través del mismo 2 mL de los disolventes: metanol - 0.1M ácido fosfórico (1:1), metanol, diclorometano y hexano. Sin dejar que los cartuchos se sequen, se cargan 2 mL de extracto, se lava el cartucho con 1 mL de hexano y se deja secar durante un período de 15 minutos. Los analitos son posteriormente eluidos con 2 mL de disolución de metanol-0.1M ácido fosfórico (1:1) y el eluato se transfiere a un tubo graduado donde se le adiciona 50 μ L de hidróxido de sodio 0.1 M. El eluato neutralizado es llevado a un volumen final de 2 mL con agua destilada, calidad HPLC. Se inyectan 100 μ L de este extracto en el sistema cromatográfico de líquidos (LC-DAD/FD): columna analítica Kromasil C₁₈ (250 x 4.6 mm d.i., diámetro de partícula 5 μ m); fase móvil, gradiente de NH₄COOCH₃ 0.01 M-acetonitrilo (Tabla 2.6) a un flujo de 1 mL·min⁻¹; detección por fluorescencia, de acuerdo a las longitudes de onda especificadas en la Tabla 2.5.

En los esquemas de las Figuras 2.15 y 2.16 se reflejan las condiciones del método recomendado.

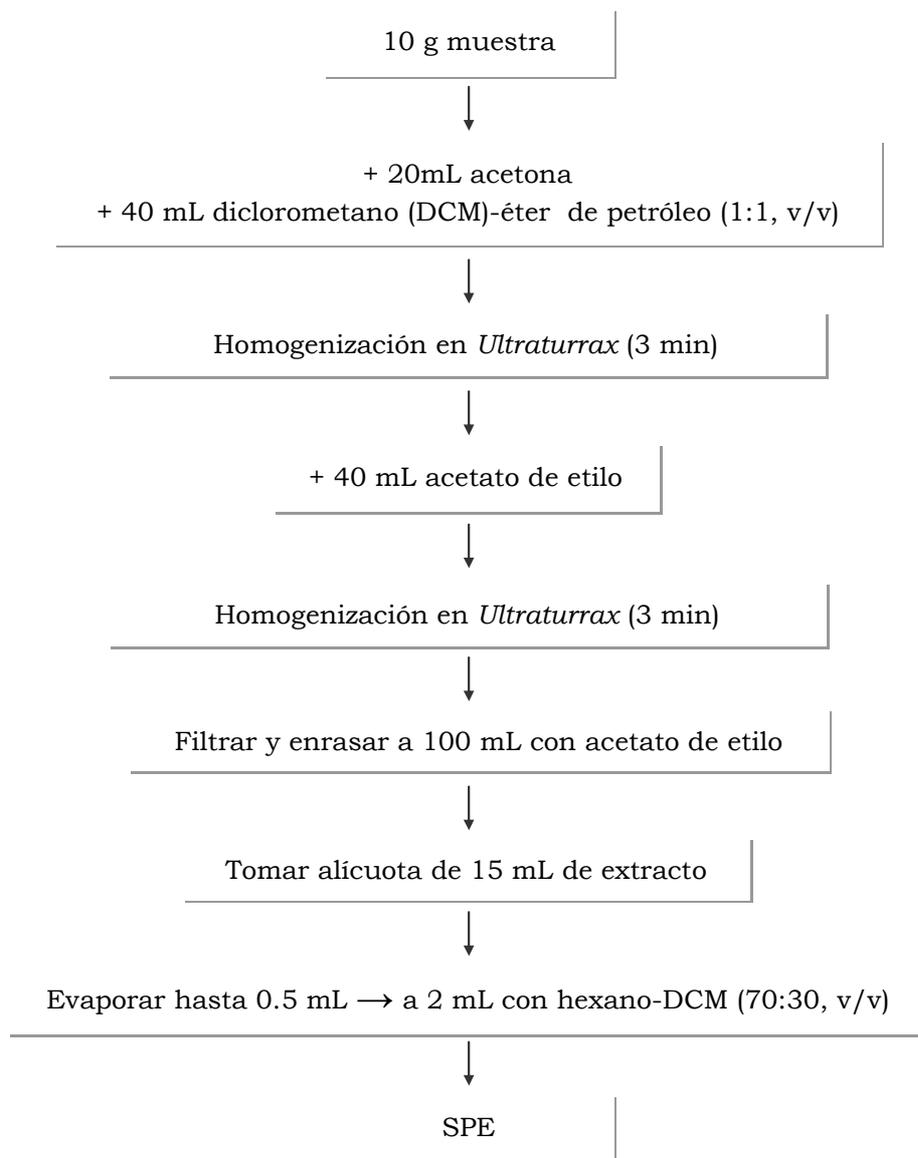


Figura 2.15. Esquema del procedimiento aplicado para la etapa de extracción de fungicidas en muestras de naranja y banana.

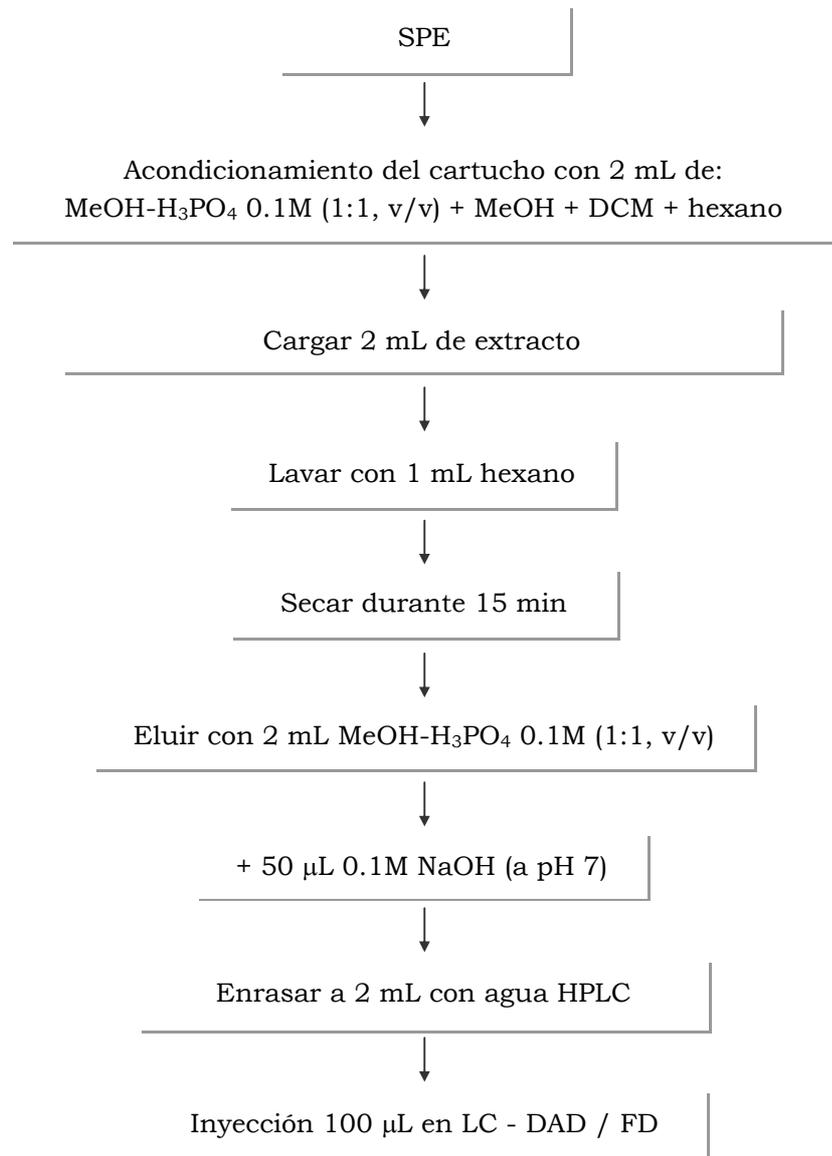


Figura 2.16. Esquema del procedimiento aplicado para la etapa de purificación de extractos de naranja y banana.

2.2.3. Validación del Método de Análisis

Para la validación del método se estudió la linealidad, especificidad, recuperación y precisión, como a continuación se detalla.

Al respecto de la especificidad del método, durante la optimización de la etapa de extracción y purificación se ha comentado sobre los interferentes en ambas matrices, concluyéndose que en naranja se encuentra presente una mayor cantidad de interferentes que en bananas.

Como posteriormente es presentado en la Figura 2.17, correspondiente a un blanco y a una muestra de naranja fortificada al nivel más bajo ensayado para cada analito, se puede observar la presencia de pequeños interferentes que co-eluyen en la misma zona de la carbendazima y del tiabendazol.

El estudio de la linealidad se realizó al evaluar las características analíticas del método con disoluciones de patrón en un rango comprendido entre 0.001 y 6.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (equivalente a 0.0013 y 8.5 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$). Los resultados indicaron que el método de cuantificación (patrón externo) fue lineal en el intervalo de concentraciones estudiado.

La exactitud y precisión del método fueron estudiadas mediante ensayos de recuperación en muestras de naranja y banana fortificadas, por triplicado, a diferentes niveles de concentración en un intervalo de 0.05 a 8 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, con todos los compuestos analizados. Las muestras extraídas y purificadas fueron analizadas en el sistema LC-FD.

Los valores de recuperación, tal como muestran las Tablas 2.12 y 2.13, fueron satisfactorios en ambas matrices para carbendazima, tiabendazol y bitertanol con recuperaciones promedio de 87, 84 y 96%, respectivamente, y con valores medios de coeficiente de variación de 11, 22 y 15%.

Sin embargo, en el caso de o-fenilfenol, los valores obtenidos en naranjas fueron alrededor de 50% con un coeficiente de variación aceptable, inferior a 12%. En el caso de bananas, las recuperaciones fueron siempre inferiores del 40% con una desviación próxima al 20%, lo cual impide la aplicación del método a esta matriz.

Tabla 2.12. Recuperaciones (%) y desviación estándar relativa para los fungicidas analizados mediante LC-FD en muestras fortificadas de naranja (n=3). Límites de detección y de cuantificación.

Fungicidas	Concentración (mg·Kg ⁻¹)	R (%)	RSD (%)	LOQ (mg·Kg ⁻¹)	LOD (mg·Kg ⁻¹)
Carbendazima	0.6	93	14	0.6	0.6
	4	103	8		
	8	84	11		
Tiabendazol	0.5	87	15	0.5	0.5
	3.2	70	2		
	6.4	71	15		
o-Fenilfenol	0.1	51	11	0.1	0.05
	1.6	51	5		
	3.2	41	11		
Bitertanol	0.05	76	7	0.05	0.01
	0.8	84	3		
	1.6	94	6		

Tabla 2.13. Recuperaciones (%) y desviación estándar relativa para los fungicidas analizados mediante LC-FD en muestras fortificadas de banana (n=3). Límites de detección y de cuantificación.

Fungicidas	Concentración (mg·Kg ⁻¹)	R (%)	RSD (%)	LOQ (mg·Kg ⁻¹)	LOD (mg·Kg ⁻¹)
Carbendazima	0.2	82	4	0.2	0.1
	2	80	1		
	4	86	3		
Tiabendazol	0.2	115	9	0.2	0.05
	1.6	85	1		
	3.2	83	5		
o-Fenilfenol	0.1	<40	19	0.1	0.05
	0.8	<40	11		
	1.6	<40	21		
Bitertanol	0.05	117	9	0.05	0.01
	0.4	100	1		
	0.8	103	2		

Inicialmente, se ensayó en muestras de naranja una concentración de $0.2 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ para fungicidas benzimidazólicos como nivel bajo de fortificación. Sin embargo, no fue posible la cuantificación de los analitos debido a la presencia de interferentes de la matriz (Figura 2.17). Se decidió, posteriormente, la validación del método con un nivel bajo de concentración 0.5 y $0.6 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ para carbendazima y tiabendazol, respectivamente. Además, se cambió la columna analítica por otra de mayor longitud (Kromasil C_{18} de 250 mm) para mejorar la separación entre analitos e interferentes (Figura 2.18). Así se consiguió la separación del interferente en el caso del tiabendazol, pero un pequeño interferente de co-elución de la carbendazima no se pudo separar completamente, por lo cual para efectos de validación, la cuantificación del analito a este nivel se realizó restando el área del blanco. Esta situación no se observó en el caso de bananas (Figura 2.19).

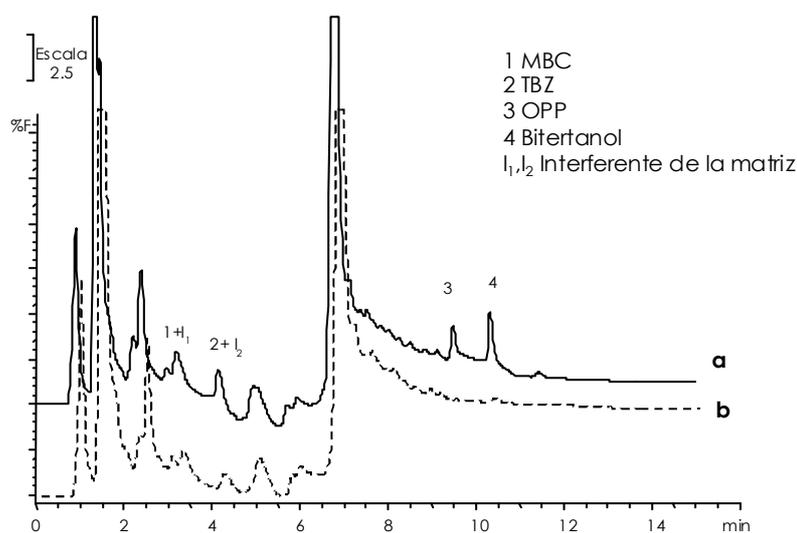


Figura 2.17. Cromatogramas LC-FD correspondiente a (a) una muestra de naranja fortificada a $0.2 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (MBC y TBZ), $0.1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (OPP) y $0.05 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (bitertanol), y (b) un blanco de muestra.

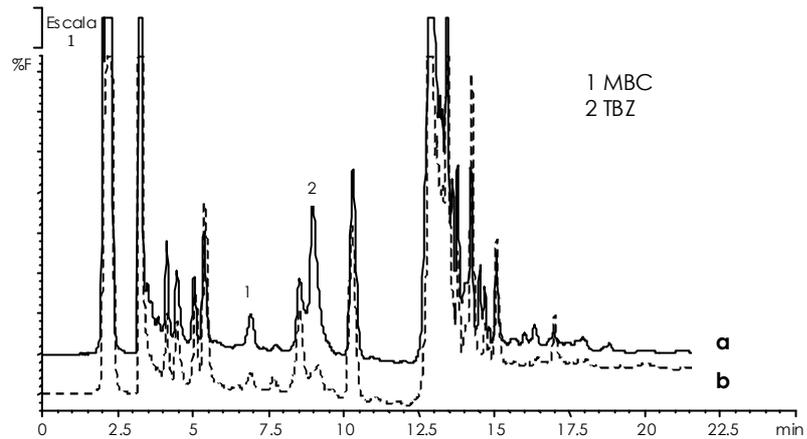


Figura 2.18. Cromatogramas LC-FD correspondientes a (a) una muestra de naranja fortificada a $0.5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (TBZ) y $0.6 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (MBC) y (b) un blanco de muestra.

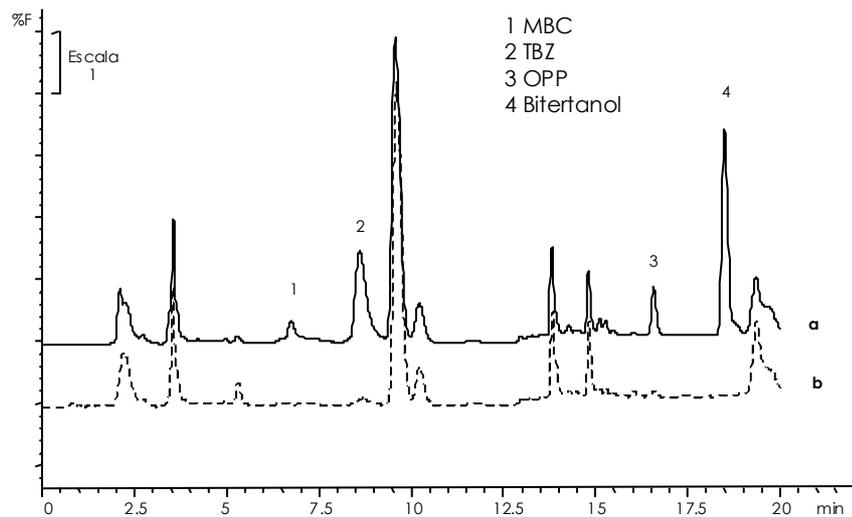


Figura 2.19. Cromatogramas LC-FD correspondientes a (a) una muestra de banana fortificada a $0.2 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (MBC y TBZ), $0.1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (OPP) y $0.05 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (bitertanol) y (b) blanco de muestra.

Los límites de cuantificación correspondieron al nivel de concentración más bajo ensayado durante la validación (Tablas 2.12 y 2.13). Los límites de detección (LOD) dependieron del material vegetal analizado y de la respuesta de cada analito, y se calcularon como tres veces la relación señal/ruido (S/N=3) a partir de cromatogramas a los niveles más bajos de concentración ensayados (Tablas 2.12 y 2.13). Los LOD y los LOQ para carbendazima y tiabendazol en naranjas fueron más altos que los obtenidos en bananas debido a la presencia de los interferentes de la matriz. A pesar de esto, el método desarrollado puede ser aplicado para ambas matrices considerando los diferentes valores de LMR establecidos.

El o-fenilfenol ha demostrado ser el analito más problemático, debido a las pérdidas parciales del compuesto durante la concentración del extracto y en la etapa de purificación. Desde un punto de vista analítico, las recuperaciones obtenidas para o-fenilfenol quedan fuera del rango normalmente aceptado (70-110%), por lo que el método, en sentido estricto, no podría ser usado para la determinación cuantitativa de este compuesto. Sin embargo, la aceptable precisión en muestras de naranja y la alta sensibilidad obtenida mediante detector por fluorescencia permitirían su aplicación, incluso con fines cuantitativos, de modo aceptable. En cualquier caso, el método permite la determinación semi-cuantitativa de este fungicida.

2.2.4. Aplicación a Muestras Reales

Finalmente, el método desarrollado y optimizado para la determinación de fungicidas seleccionados se aplicó a muestras reales de naranjas y bananas que, como anteriormente ha sido mencionado, fueron adquiridas en su mayoría en tiendas de productos vegetales y supermercados.

En varias de las muestras de naranja analizadas se detectaron tiabendazol y o-fenilfenol, fungicidas aplicados típicamente como compuestos post-cosecha para la conservación de la fruta durante los periodos de almacenamiento y transporte. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 2.14, en donde se observa que en 8 muestras de las 13 analizadas se detectaron residuos de tiabendazol y en otras 8 se encontraron residuos de o-fenilfenol. Los niveles de concentración para tiabendazol fueron entre 0.5 y 5.5 mg·Kg⁻¹,

mientras que para o-fenilfenol fueron entre 0.1 y 1.3 mg·Kg⁻¹. Una de las muestras registró valores superiores al límite máximo de residuos establecido para tiabendazol en naranjas (5 mg·Kg⁻¹).

Tabla 2.14. Concentración de los fungicidas en las muestras de naranja analizadas mediante el método LC-FD.

Muestras	Concentración (mg·Kg ⁻¹)	
	Tiabendazol	o-Fenilfenol
Naranja 1	5.5	1.3
Naranja 2	1.3	0.8
Naranja 3	2.5	0.7
Naranja 4	2.3	0.4
Naranja 5	2.0	0.5
Naranja 6	n.d.	n.d.
Naranja 7	2.2	n.d.
Naranja 8	n.d.	n.d.
Naranja 9	n.d.	n.d.
Naranja 10	1.6	0.1
Naranja 11	0.5	0.2
Naranja 12	n.d.	n.d.
Naranja 13	n.d.	0.3

n.d., no detectado

Tabla 2.15. Concentración de los fungicidas en las muestras de banana analizadas mediante el método LC-FD.

Muestras	Concentración (mg·Kg ⁻¹)	
	Tiabendazol	Bitertanol
Banana 1	n.d.	n.d.
Banana 2	n.d.	n.d.
Banana 3	n.d.	n.d.
Banana 4	n.d.	0.20
Banana 5	<0.2	n.d.
Banana 6	0.4	n.d.
Banana 7	0.3	n.d.
Banana 8	n.d.	0.50
Banana 9	n.d.	0.30

n.d., no detectado

En el caso de muestras reales de banana analizadas, se detectó la presencia de tiabendazol y bitertanol, cada uno, en 3 muestras de las 9 analizadas. Los valores encontrados (Tabla 2.15) fueron del orden de 0.2-0.5 mg·Kg⁻¹, inferiores al límite máximo permisible de 5 y 0.05 mg·Kg⁻¹ para

tiabendazol y bitertanol, respectivamente, de acuerdo a la legislación para bananas.

Los fungicidas detectados en las muestras analizadas, tanto de naranjas como bananas, fueron confirmados comparando los espectros de absorción entre muestras y disoluciones patrón, obtenidos mediante detección por DAD. A modo de ejemplo, se muestran en las Figuras 2.20 y 2.21, cromatogramas de muestras positivas de naranja y banana, con sus respectivos espectros de confirmación. En algunos casos como o-fenilfenol en naranjas, el espectro del compuesto parece verse influenciado por la presencia de la matriz, en especial cuando se trata de concentraciones bajas de analito, dando lugar a un valor de match inferior a 800, considerado adecuado para efectos de confirmación.

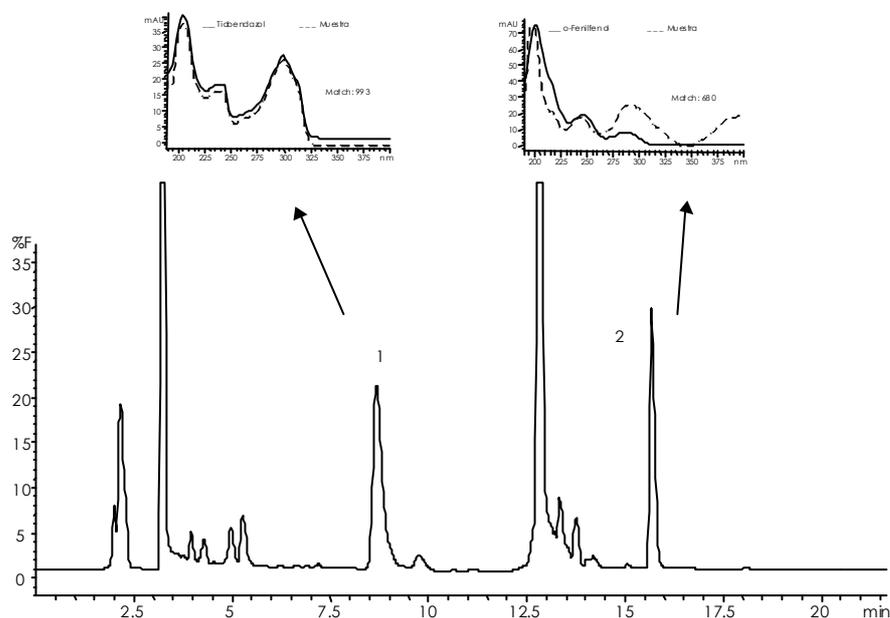


Figura 2.20. Cromatograma LC-FD correspondiente a la muestra naranja 2, detectándose presencia de (1) tiabendazol ($1.3 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$), (2) o-fenilfenol ($0.8 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$). Confirmación mediante espectros por DAD.

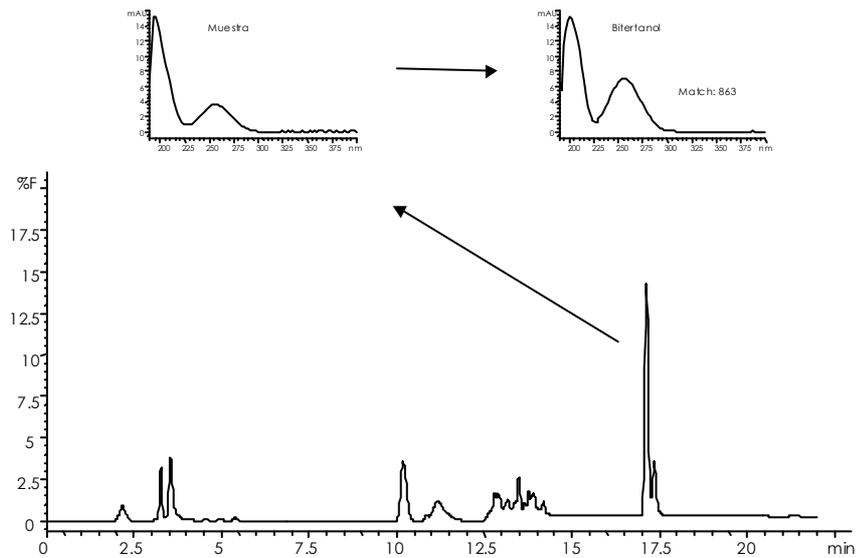


Figura 2.21. Cromatograma LC-FD correspondiente a la muestra banana 4, detectándose presencia de bitertanol ($0.20 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$). Confirmación mediante espectros por DAD.

En algunas de las muestras analizadas se detectaron fungicidas (tiabendazol y o-fenilfenol) en concentraciones inferiores al límite de cuantificación. En estos casos, las muestras fueron analizadas también por LC-MS, confirmándose su presencia en las muestras. En el capítulo relativo al desarrollo de un método para la determinación de fungicidas mediante LC-MS/MS, se discutirán los resultados obtenidos con más detalle, así como la confirmación de los resultados mediante este sistema cromatográfico.

En las Figuras 2.22, 2.23 y 2.24 se muestran gráficas relativas a los resultados obtenidos en muestras reales. Solamente la muestra naranja 1 sobrepasó levemente al límite máximo de residuos establecido para tiabendazol.

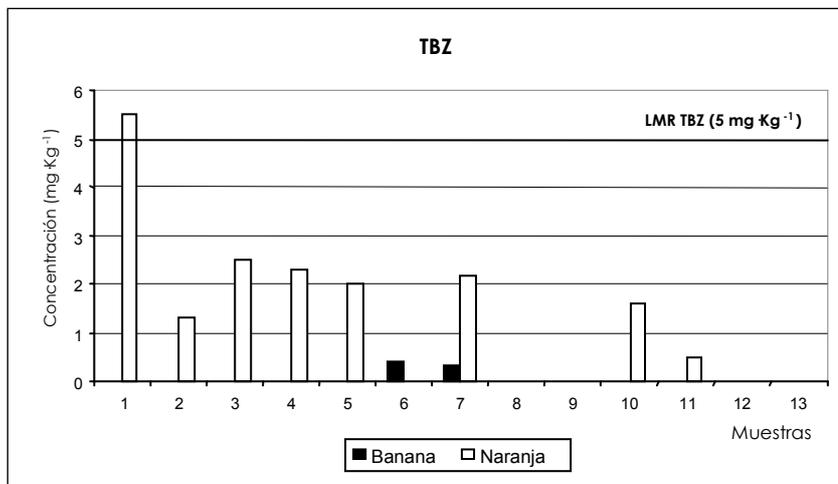


Figura 2.22. Resultados del análisis de muestras reales de naranjas y bananas relativos al contenido de tiabendazol (método LC-FD).

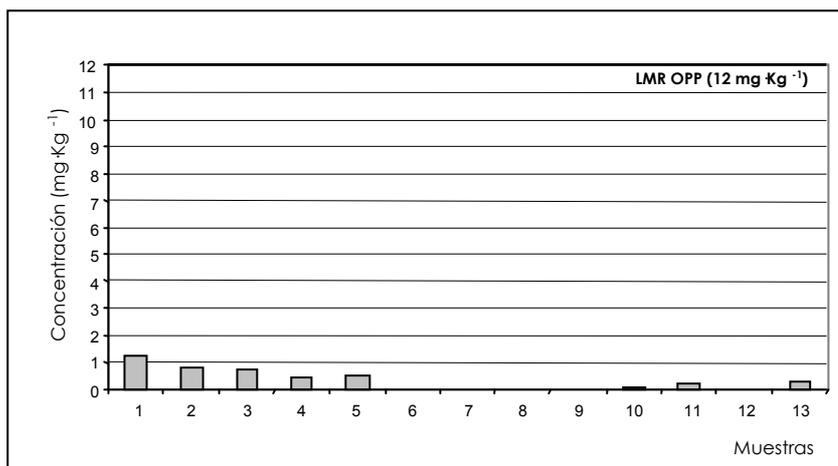


Figura 2.23. Resultados del análisis de muestras reales de naranjas relativos al contenido de o-fenilfenol(método LC-FD).

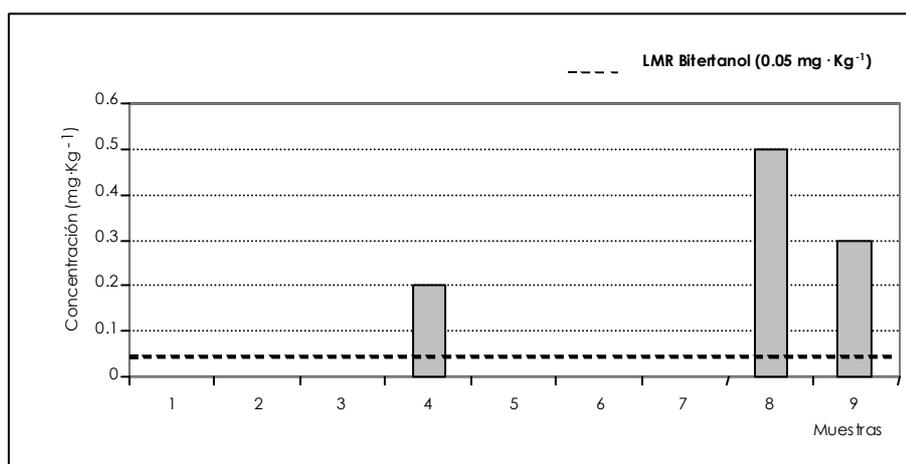


Figura 2.24. Resultados del análisis de muestras reales de relativas al contenido de bitertanol (método LC-FD)

2.3 DETERMINACIÓN DE FUNGICIDAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS)

Considerando el interés de los métodos multiresiduales mediante técnicas cromatográficas para la determinación de residuos de plaguicidas y con la finalidad de conseguir una adecuada separación de los compuestos en un tiempo razonable de análisis, en el presente apartado se desarrolla una metodología analítica multiresidual para la determinación de fungicidas seleccionados mediante cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS), que permite la determinación y confirmación de los analitos con una adecuada sensibilidad.

Los fungicidas seleccionados fueron: o-fenilfenol (OPP), dicloran, clorotalonil, tiabendazol, imazalil, propiconazol y bitertanol. Cabe indicar que entre los compuestos estudiados se consideró inicialmente la inclusión de tridemorf por su amplia utilización, principalmente en el cultivo de bananas en Ecuador. Sin embargo, las características de este compuesto no son adecuadas para su determinación por GC, por lo que se decidió su exclusión. Los fungicidas seleccionados, de acuerdo con la bibliografía consultada, son adecuados para su determinación por GC. Aunque tiabendazol y o-fenilfenol suelen ser analizados habitualmente mediante técnicas de LC, se decidió su inclusión ampliando de esta manera la multiresidualidad del método.

Partiendo del método de extracción aplicado en el apartado anterior, el primer objetivo ha sido optimizar un método de purificación mediante SPE previo a la inyección de los extractos en el sistema de cromatografía de gases.

El desarrollo del método de purificación supuso el estudio de varios tipos de adsorbentes, así como la optimización de variables tales como disolvente y volumen de extracto, volumen de elución y tipo de eluyente.

Adicionalmente a la aplicación de la etapa de purificación mediante SPE, se consideró el empleo de un material de relleno, como carbofrit en el *liner* del bloque de inyección, con objeto de reducir la cantidad de compuestos co-

extraídos introducidos en el equipo y favorecer así su mantenimiento, prolongando la vida útil de la columna analítica.

Si tenemos en cuenta que muchos de los componentes de las muestras presentan escasa volatilidad, es de suponer el perjuicio producido en el sistema cromatográfico por la sucesiva inyección de tales muestras. Esto conlleva además, que para mantener las condiciones iniciales de sensibilidad y resolución, se requiere un aumento en la frecuencia de limpieza del equipo, especialmente en aquellas partes más sensibles a la acumulación de impurezas como son el inyector, la columna y la misma fuente de ionización en el caso de GC-MS [26].

Con la finalidad de mejorar la retención de componentes no volátiles en el portal de inyección, se evaluó el empleo de material de un relleno que no suponga la adsorción reversible de los analitos o incluso degradaciones de los mismos. En este sentido, varios autores se refieren al uso de carbofrit en el sistema de inyección con resultados satisfactorios en sus investigaciones [26-29]. Así pues, se evaluó el uso de Carbofrit™, material de carbón disponible en forma de pequeños bloques cilíndricos, cuya introducción en el *liner* del inyector se debe realizar de forma manual, ubicándolo hasta casi el fondo del *liner*, de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Entre las ventajas que proporciona el uso de carbofrit cabe señalar que prolonga la vida útil de la columna cromatográfica, permite la reproducibilidad de la inyecciones, mejora la vaporización de la muestra con una alta inercia entre los componentes de la matriz y este material de relleno, mayor estabilidad de la temperatura de inyección y retención de partículas contaminantes de elevado peso molecular [30].

La determinación final de los analitos se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (cuadrupolo) que es la técnica más comúnmente empleada actualmente para el análisis de compuestos orgánicos volátiles y semi-volátiles en muestras de interés ambiental y agroalimentario. El alto número de aplicaciones utilizando esta técnica es consecuencia de la eficiencia de la separación cromatográfica mediante GC y la calidad de la información, así como la adecuada sensibilidad y selectividad proporcionada por la espectrometría de masas. Diversas técnicas de ionización pueden ser utilizadas en GC-MS. Entre ellas, la ionización por

impacto electrónico (EI) es la más popular puesto que produce tanto iones moleculares como iones fragmentados. La *MS fragmentation pattern* permite la identificación de compuestos ambiguos mediante comparación con una librería de espectros. Aunque la búsqueda de librería es una herramienta poderosa para la identificación de desconocidos, esta identificación requiere una serie de condiciones adicionales que deben ser satisfechas (inclusión del compuesto de interés en la librería, obtención de ambos espectros en condiciones de espectrometría de masas similares, separación cromatográfica eficiente para la obtención de espectros de masas limpios). Para garantizar la correcta identificación y evitar falsos positivos pueden ser adoptadas diferentes estrategias. La EPA propone el uso de, por lo menos, 2 iones para cada analito y que la abundancia relativa de ambos iones debe ser entre un 15 – 20% [30]. Estos criterios han sido tenidos en cuenta en la aplicación del método propuesto en esta Memoria.

Para la cuantificación de los analitos se ha utilizado el método de patrón externo usando calibrado en matriz con objeto de compensar el efecto de la misma.

Una vez validado el método de análisis, se llevó a cabo su aplicación a muestras reales de bananas y naranjas, comparando los resultados con los obtenidos al inyectar estos mismos extractos en un equipo GC-MS/MS (trampa de iones).

2.3.1. Experimental

Patrones

Los patrones sólidos de o-fenilfenol y tiabendazol (99.8% de pureza), dicloran y bitertanol (98%), clorotalonil (98.5%), imazalil (97.5%) y propiconazol (97%) fueron suministrados por Dr. Ehrenstorfer (Promochem, Wesel, Alemania).

Disoluciones stock de concentración aproximada $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ se prepararon por pesada. 25 mg de cada compuesto fueron disueltos en 50 mL de acetona. Las disoluciones se almacenaron en congelador a -18°C . A partir de estas disoluciones individuales se prepararon las mezclas de patrones

(soluciones de trabajo) mediante dilución en hexano, almacenándose en frigorífico a 4°C.

Los disolventes orgánicos utilizados (diclorometano, éter de petróleo, acetato de etilo, hexano, metanol, acetona, éter dietílico y metil ter-butyl éter) fueron de calidad para análisis de residuos de plaguicidas y suministrados por Scharlab (Barcelona, España).

El gas Helio (99.99995% de calidad) utilizado como gas portador fue suministrado por Carbueros Metálicos (Barcelona, España).

Material

El material de vidrio utilizado durante la realización del estudio consistió básicamente en vasos de precipitados, tubos graduados de 15 mL provistos de tapón de vidrio esmerilado, pipetas Pasteur y probetas graduadas. El material volumétrico (pipetas y matraces aforados) fue tipo A.

La extracción en fase sólida (SPE) se realizó de forma manual con cartuchos de 3 y 6 mL con relleno de 0.5 y 1 g, respectivamente, de fase *LC-Florisil* y *LC-Si* de Supelco (Sigma-Aldrich, Madrid, España), y cartuchos de 3 mL con relleno de 0.5 g de *Bond-Elut diol* de Varian (Scharlab, Barcelona, España), mediante un dispositivo para preparación de muestras por SPE de Varian (Harbor City, California, USA), equipado con bomba de vacío.

Los extractos de muestra fueron inyectados en el sistema cromatográfico utilizando un pequeño bloque de CarboFrit, tamaño ≤ 4 mm de Supelco (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Otros aparatos como la trituradora K55E (Dito Sama, Francia), agitador Ultraturax T25 (Janke and Kunkel, Alemania), bloque calefactor Multiblock (Selecta) fueron utilizados durante la preparación y procesamiento de las muestras.

Muestras

Al igual que en el método multiresidual basado en LC-FD/DAD, las muestras utilizadas para la optimización y validación del método mediante GC-

MS se obtuvieron de una cooperativa de productos agrícolas ecológicos, comprobándose su condición de muestra blanco. Las muestras (completas con piel), tanto de bananas como de naranjas, fueron trituradas independientemente y almacenadas en recipientes de aproximadamente 100 g y guardadas en congelador a -18°C hasta su utilización.

Las muestras reales de naranjas y bananas analizadas fueron las mismas utilizadas en la aplicación del método mediante LC, indicándose su respectiva identificación en las Tablas 2.1 y 2.2.

Fortificación

El procedimiento general de fortificación de muestras blanco de naranja durante las pruebas preliminares consistió en añadir a 10 g de muestra el volumen adecuado de disolución patrón en hexano con pipeta volumétrica de vidrio para un nivel de fortificación de $2\text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ para todos los compuestos. En el caso de imazalil la concentración fue el doble de los demás compuestos, es decir, $4\text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$.

En cuanto a la validación del método, la fortificación de muestras de naranjas y bananas se ha llevado a cabo a tres niveles de concentración (0.05 , 0.5 y $2\text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$). La fortificación se ha realizado adicionando a 10 g de muestra el volumen adecuado de disolución patrón (0.5 ó 1 mL) con pipeta volumétrica de vidrio, para alcanzar los niveles de concentración seleccionados. En el caso del imazalil los niveles de concentración fueron siempre el doble que para los demás compuestos (0.1 , 1 y $4\text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$).

Después del procedimiento de fortificación, las muestras se dejaron en reposo aproximadamente una hora antes de ser procesadas de acuerdo con el método de análisis desarrollado.

Equipos Instrumentales

Las determinaciones cromatográficas fueron realizadas en un sistema de cromatografía de gases Hewlett-Packard 5890 series II equipado con detector selectivo de masas MSD 5971, autoinyector HP 7673 y columna capilar HP-5MS (5% fenil metil siloxano) de $25\text{ m} \times 0.25\text{ mm d.i.}$, $0.25\text{ }\mu\text{m}$. Helio fue usado como

gas portador a 0.6 mL min^{-1} . La temperatura del inyector fue de 250°C . El programa de temperatura del horno optimizado fue el siguiente: 80°C durante 1 min, a $30^\circ\text{C min}^{-1}$ hasta 200° (6 min), a $10^\circ\text{C min}^{-1}$ hasta 230°C (5 min), a $5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ hasta 270°C (5 min). Las características del detector de masas fueron: modo de impacto electrónico (70 eV) con un multiplicador de voltaje de 2200V; la temperatura de la línea de transferencia fue de 280°C , rango de masas para las experiencias en *full scan* 50-500 *m/z*. El análisis se llevó a cabo mediante el modo de detección selectiva de iones (SIM). El volumen de inyección fue de $2 \mu\text{L}$ en modo *splitless*. El tratamiento de la señal cromatográfica y la recogida de datos fue realizada mediante el programa HP 5890 Series II Chem Station (versión B.02.05).

Para la confirmación de los resultados en muestras reales mediante GC-MS/MS, se utilizó un cromatógrafo de gases GC 8000 Top (CE Instruments, Milan, Italy) equipado con un espectrómetro de masas de trampa de iones (Finnigan GCQ, Austin, Texas, USA) operando en modo de ionización por impacto electrónico (EI) y con un autoinyector AS 800. Las características de la columna capilar utilizada fueron: sílice fundida DB-5MS (5% fenil metil siloxano) de $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm d.i.}$, $0.25 \mu\text{m}$. Helio fue utilizado como gas portador a 1 mL min^{-1} . El programa de temperatura del horno fue el mismo que el optimizado en GC-MS (HP). La temperatura del inyector fue de 240°C . Las inyecciones de $2 \mu\text{L}$ de muestra fueron llevadas a cabo en modo *splitless* utilizando un *glass liner* de 5 mm d.i. con carbofrit.

Las condiciones experimentales del espectrómetro de masas fueron las siguientes: temperaturas de la fuente y la línea de transferencia 220°C y 275°C , respectivamente; potencial del multiplicador 1650 V; los valores de *automatic gain control (AGC)* y *trap offset* fueron de 50 y 10, respectivamente. La recogida de datos fue realizada mediante el programa *Xcalibur* (versión 1.1). La cuantificación de las muestras se llevó a cabo mediante calibrado de patrón externo en matriz tanto para detección por GC-MS como GC-MS/MS.

2.3.2. Resultados y Discusión

Optimización de las Condiciones Cromatográficas

Como primer paso en el desarrollo de este método de análisis, se realizó la optimización del programa de temperatura del horno mediante la inyección en modo *scan* de disoluciones hexánicas de patrón de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de concentración de los fungicidas seleccionados. Se seleccionaron las condiciones indicadas en el apartado de instrumentación, que permitieron una resolución adecuada de todos los analitos, como puede observarse en la Figura 2.25, correspondiente a una disolución patrón en hexano de $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

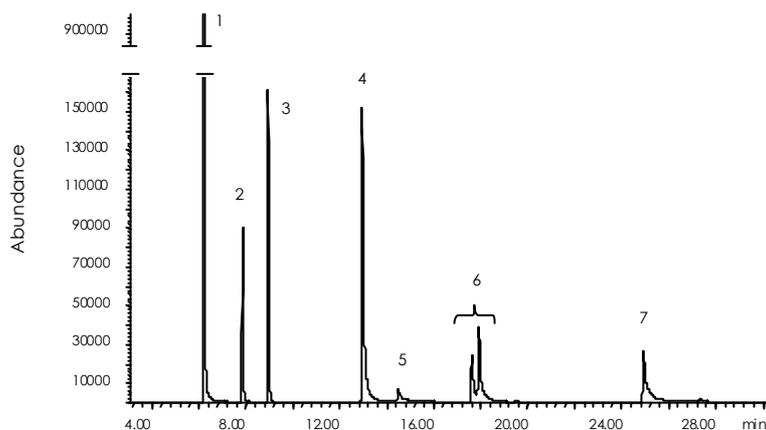


Figura 2.25. Cromatograma GC-MS (modo SIM) de una disolución patrón de $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de OPP (1), dicloran (2), clorotalonil (3), tiabendazol (4), imazalil (5), propiconazol (6) y bitertanol (7). Volumen de inyección $2 \mu\text{L}$.

Aunque la identificación de residuos mediante GC/MS es mejor cuando se escanean todos los iones (modo *scan*) y se compara el espectro de masas de la muestra con los del patrón de referencia, esto causa una importante pérdida de la sensibilidad, por lo que, generalmente, para la determinación cuantitativa de residuos se utiliza la monitorización selectiva de iones (modo SIM).

Por tanto, a partir de los espectros de masas de cada uno de los compuestos obtenidos mediante la inyección de las disoluciones patrón en modo *scan*, se seleccionaron los iones (m/z) para cada analito en estudio. La adquisición de datos en modo SIM da lugar a cromatogramas más limpios y, por tanto, a métodos más selectivos. Sin embargo, a pesar de las ventajas en cuanto

a sensibilidad y selectividad, el uso del modo SIM reduce la capacidad de identificación de un método al no registrar el espectro completo de los compuestos, sino sólo los iones seleccionados. Por ello, y con el fin de alcanzar un compromiso entre sensibilidad y capacidad de identificación, se seleccionaron tres iones diagnóstico para cada compuesto, siempre que fue posible. De esta forma, se cumplían los requisitos establecidos como criterios de identificación, a la vez que se aumentaba la sensibilidad del método [26]. La Figura 2.26 muestra los espectros de masa obtenidos para los distintos fungicidas estudiados.

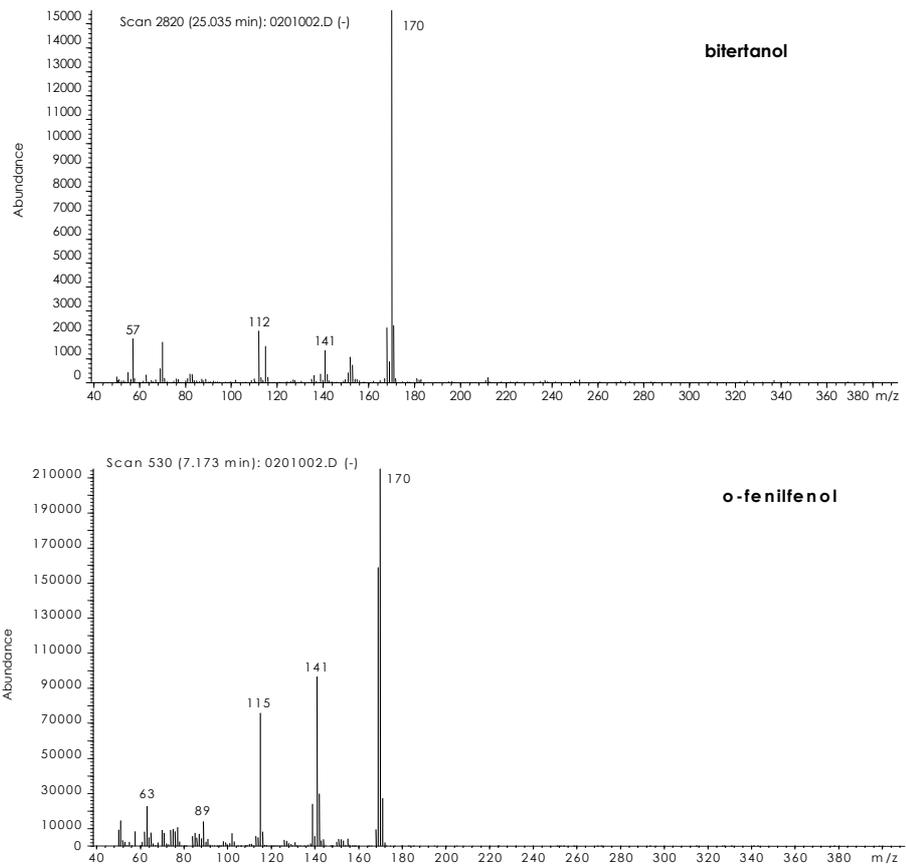


Figura 2.26. Espectros de masas correspondientes a los fungicidas seleccionados, obtenidos a partir de los cromatogramas GC-MS de una disolución patrón de concentración $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

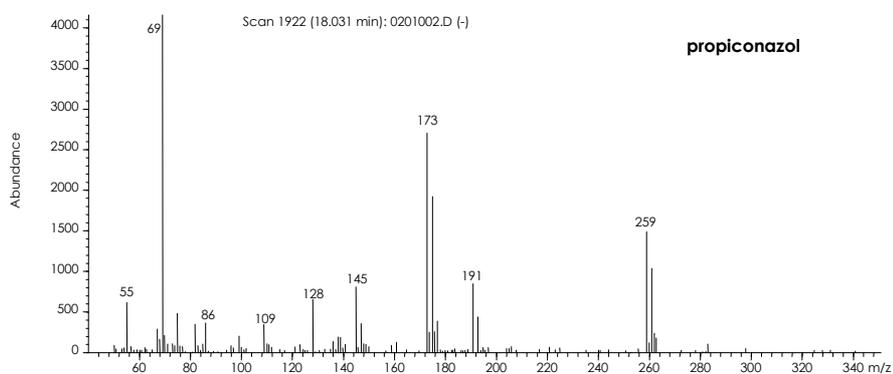
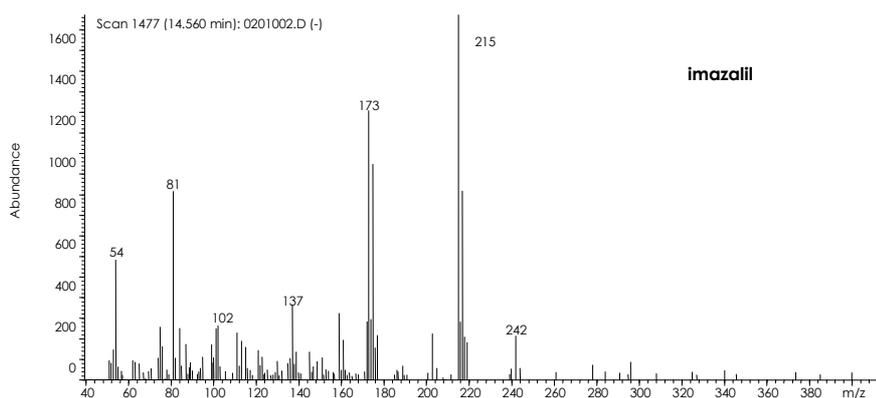


Figura 2.26. Espectros de masas correspondientes a los fungicidas seleccionados, obtenidos a partir de los cromatogramas GC-MS de una disolución patrón de concentración $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Los iones seleccionados para la determinación por GC-MS mediante impacto electrónico en modo SIM se muestran en la Tabla 2.16.

Tabla 2.16. Iones seleccionados para la determinación de los fungicidas mediante GC-MS en modo SIM.

Fungicidas	t_R (min)	Peso mol (g)	m/z		
OPP	6.03	170.2	<u>170</u>	141	115
Dicloran	7.60	207.0	<u>160</u>	176	<u>206</u>
Clortalonil	8.64	265.9	<u>266</u>	229	194
TBZ	12.57	201.2	<u>201</u>	<u>174</u>	
Imazalil	14.13	297.2	<u>215</u>	173	159
Propiconazol	17.11	342.2	<u>173</u>	259	191
Bitertanol	24.44	337.4	<u>170</u>	141	152

En el caso del tiabendazol, sólo se escogieron dos iones, puesto que no hubo otro de importancia por su abundancia excepto el ión (m/z) 129, el cual no fue suficientemente selectivo ya que era común para un interferente. A efectos de cuantificación se optó por la detección en modo *extract ion* mediante la selección del ión más abundante o específico de cada analito, debido a la mayor selectividad y sensibilidad proporcionada. En la Tabla 2.16 se subrayan los iones seleccionados para llevar a cabo la cuantificación de cada analito mediante el modo *extract ion*.

En la Figura 2.27 se muestran los cromatogramas GC-MS (*extract ion*) obtenidos a partir de la inyección de una disolución hexánica de patrón mezcla de los fungicidas seleccionados a un nivel de concentración $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, excepto para el imazalil ($1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), en modo SIM y en las condiciones cromatográficas óptimas.

Al respecto, se puede observar que los picos de tiabendazol e imazalil forman típicamente una pequeña cola difícil de corregir durante el análisis por GC. En el caso de propiconazol se consiguió la adecuada separación cromatográfica de sus dos isómeros, mientras que, los dos isómeros del bitertanol co-eluyen al mismo tiempo dando lugar a la pequeña cola que presenta el pico.

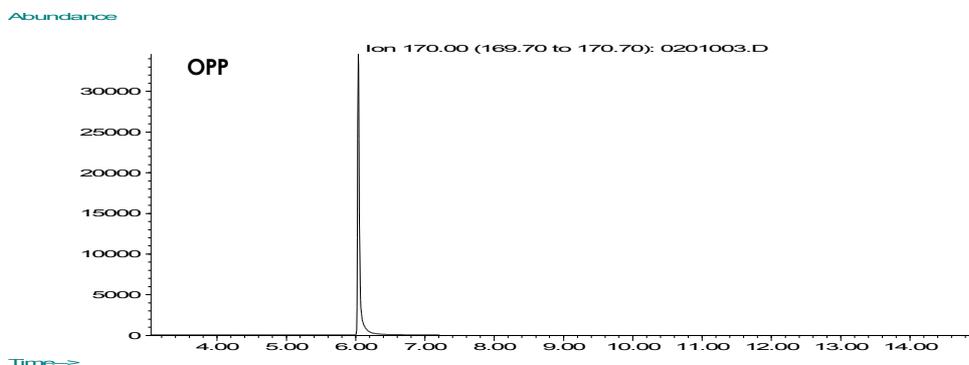


Figura 2.27. Cromatogramas GC-MS (*extract ion*) correspondientes a una disolución mezcla de patrón de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de OPP, dicloran, clorotalonil, tiabendazol, propiconazol, bitertanol y $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de imazalil.

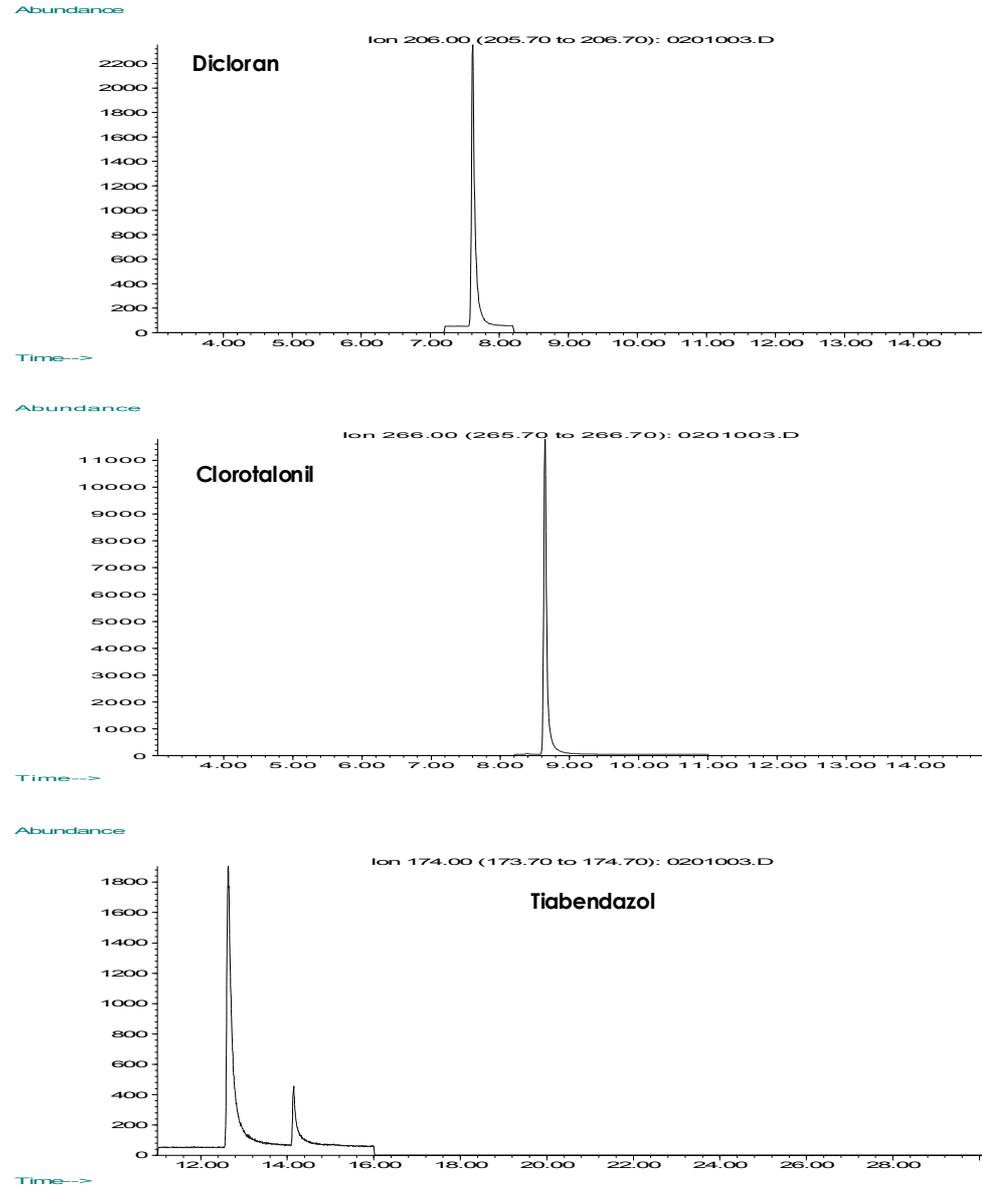


Figura 2.27. Cromatogramas GC-MS (extract ion) correspondientes a una disolución mezcla de patrón de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de OPP, dicloran, clorotalonil, tiabendazol, propiconazol, bitertanol y $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de imazalil.

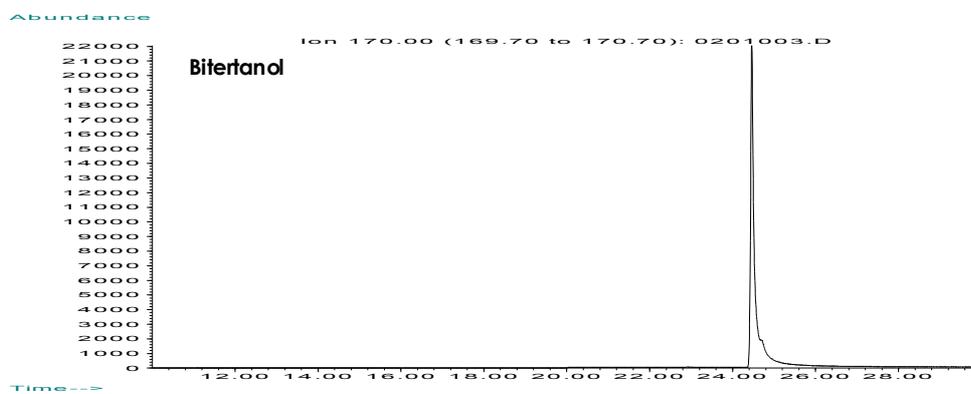
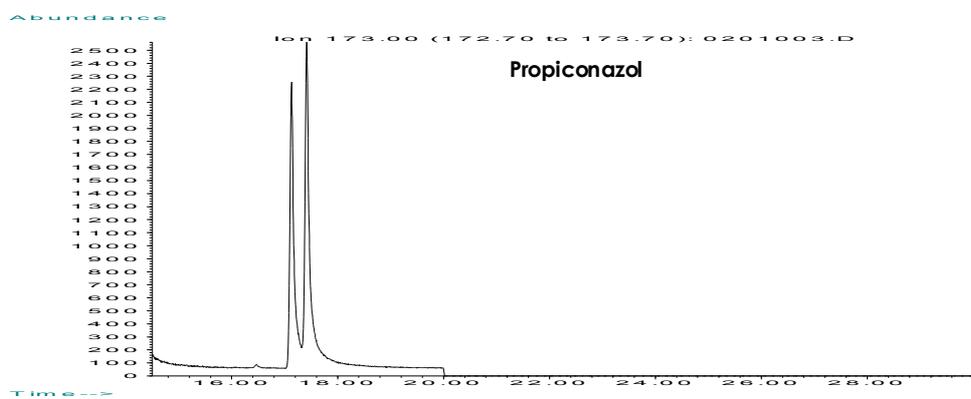
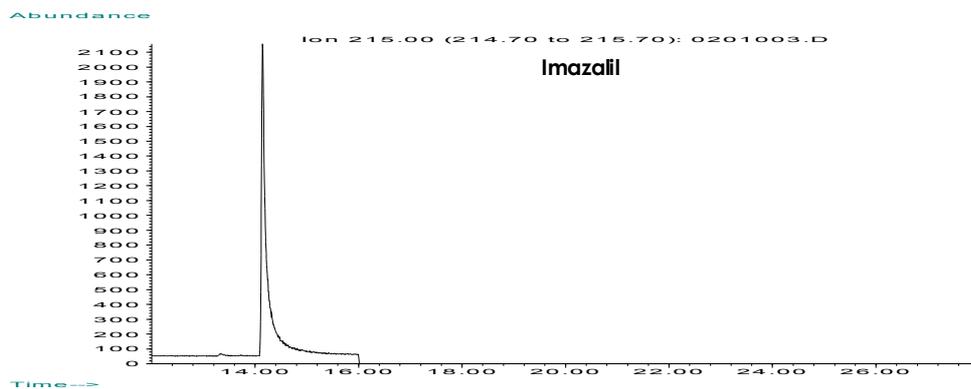


Figura 2.27. Cromatogramas GC-MS (extract ion) correspondientes a una disolución mezcla de patrón de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de OPP, dicloran, clorotalonil, tiabendazol, propiconazol, bitertanol y $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de imazalil.

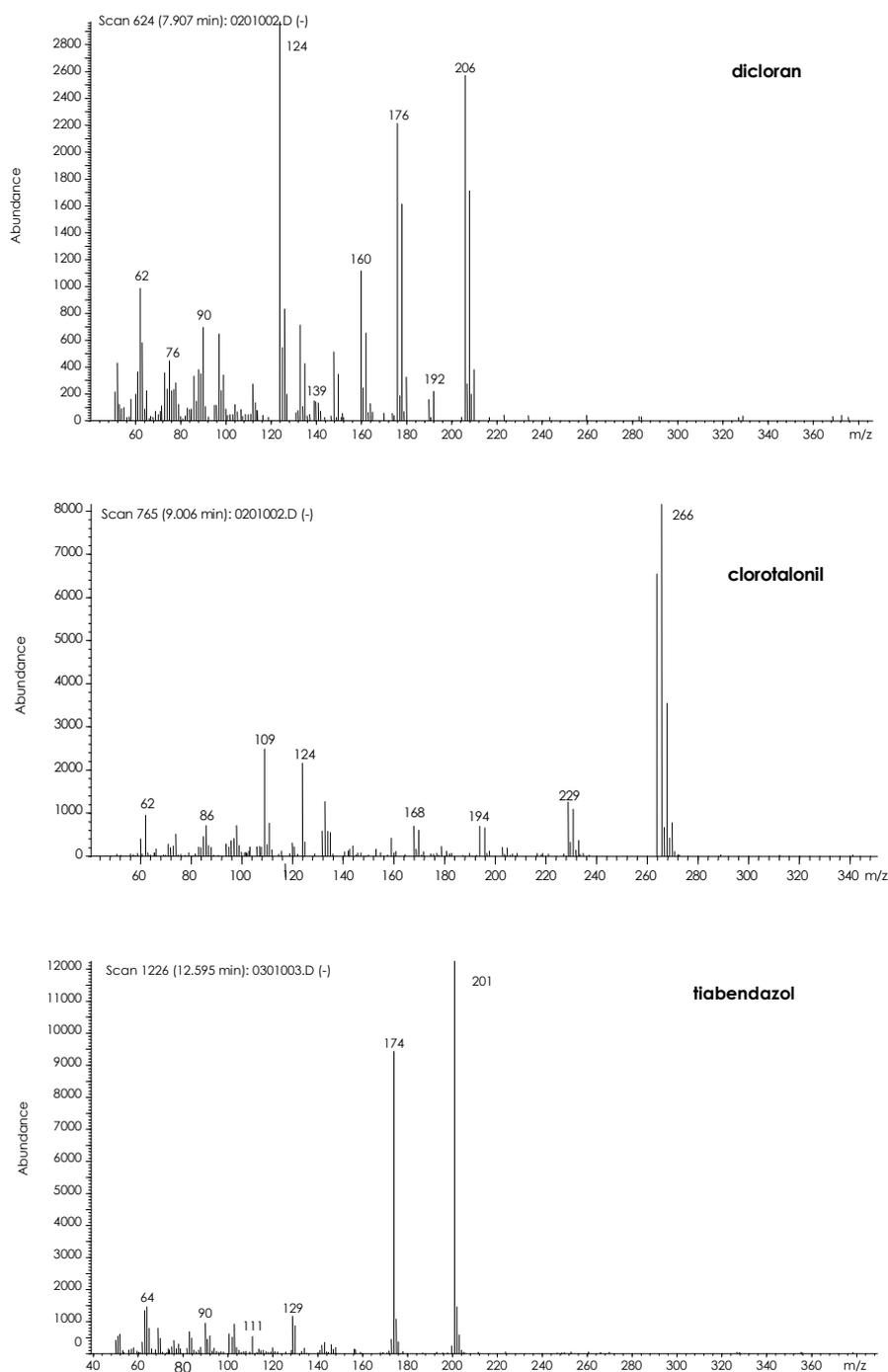


Figura 2.26. Espectros de masas correspondientes a los fungicidas seleccionados, obtenidos a partir de los cromatogramas GC-MS de una disolución patrón de concentración $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

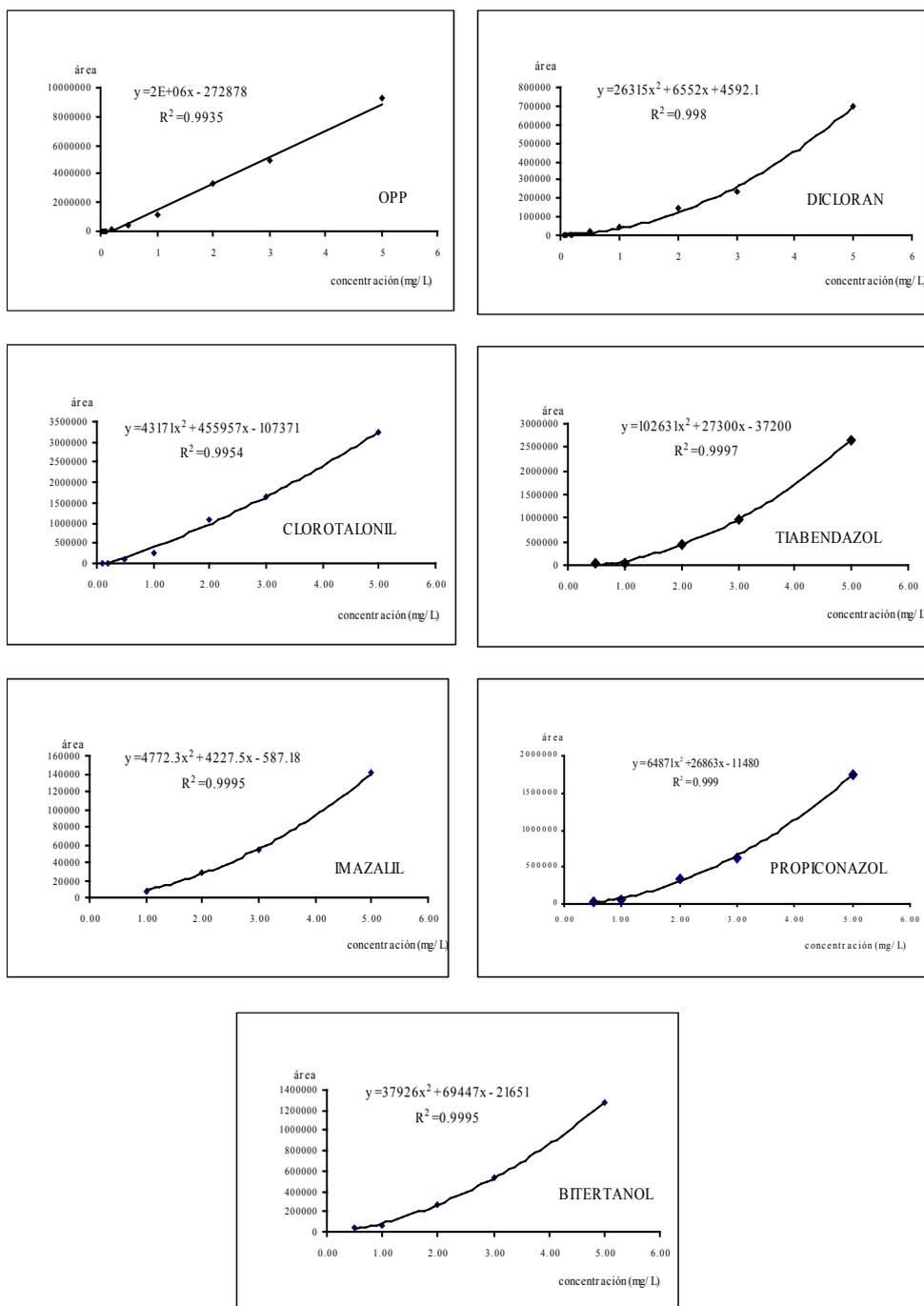
Características Analíticas del Método Cromatográfico

Se ha estudiado la linealidad de la respuesta cromatográfica (detección en modo SIM con cuantificación mediante *extract ion*) para los diferentes fungicidas mediante la inyección de disoluciones hexánicas patrón. Los intervalos de concentración para los que se ha comprobado que la respuesta es lineal son distintos para cada compuesto y se indican en la Tabla 2.17. Las respuestas obtenidas se ajustan a curvas de calibración de segundo orden (excepto para o-fenilfenol que es de primer orden) con valores de coeficiente de correlación superiores a 0.997. En la Figura 2.28 se muestran las curvas de calibrado obtenidas, indicando en cada una de ellas la ecuación correspondiente.

Tabla 2.17. Linealidad y LOD obtenidas con disolución patrón mediante GC-MS con detección en modo *extract ion*.

<i>Fungicidas</i>	<i>Rango de concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)</i>	<i>LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)</i>
OPP	0.02–5.0	0.01
Dicloran	0.05–5.0	0.03
Clorotalonil	0.05–4.0	0.02
TBZ	0.50–5.0	0.10
Imazalil	1.0–5.0	0.50
Propiconazol	0.20–5.0	0.10
Bitertanol	0.50–5.0	0.10

En cuanto a los límites de detección, se calcularon como la concentración de analito que proporcionaba una relación señal-ruido de tres, a partir de cromatograma correspondiente al nivel de concentración más bajo de la curva del calibrado. Los LOD obtenidos son inferiores o iguales a $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, excepto para el imazalil ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).



Figuras 2.28. Curvas de calibrado para los fungicidas seleccionados obtenidas a partir de disoluciones hexánicas de patrón inyectadas en el sistema GC-MS (modo extract ion).

Etapa de Extracción

El método de extracción optimizado y descrito en el apartado anterior ha sido aplicado para la determinación de fungicidas seleccionados mediante GC, tal como se describe en el esquema de la Figura 2.29.

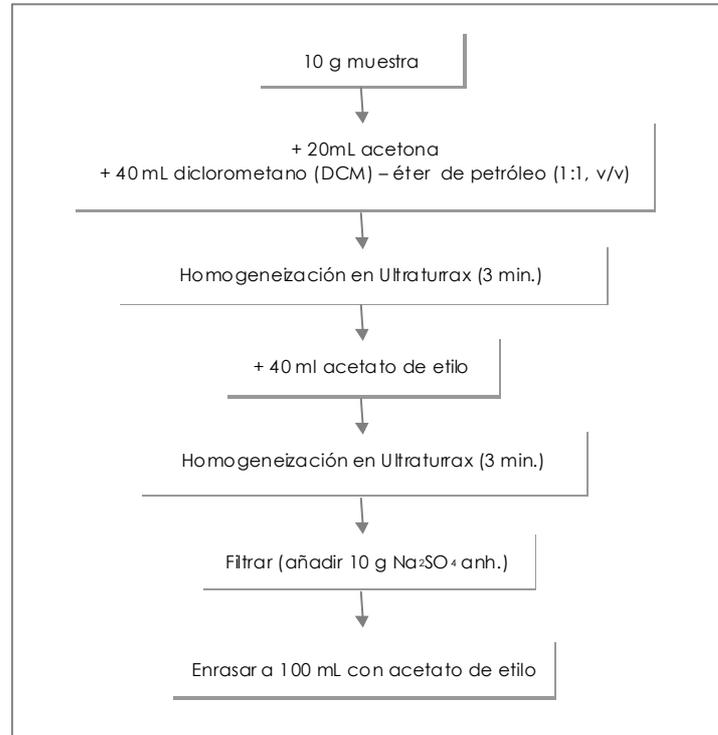


Figura 2.29. Esquema de las condiciones optimizadas para la etapa de extracción

El método de extracción consiste en la adición a 10 g de muestra de naranja o banana de, en primer lugar, 20 mL de acetona y 40 mL de diclorometano-éter de petróleo (1:1) y, posteriormente, 40 mL de acetato de etilo, agitando con Ultraturax durante 3 minutos después de cada adición de disolvente. El extracto obtenido se filtra, añadiendo 10 g de sulfato de sodio anhidro para eliminar los restos de agua, y se lleva a un volumen de 100 mL en matraz aforado con acetato de etilo, a partir del cual se toman alícuotas de un volumen apropiado para el posterior procedimiento de purificación mediante SPE.

Se evaluó la estabilidad de los fungicidas durante el proceso de evaporación y de cambio de disolvente como paso previo a la etapa de purificación. Se ensayó con una disolución patrón preparada en una mezcla de disolventes similar a la de extracción, tomando una alícuota de 5 mL que fue evaporada, sin llegar a sequedad, y redisolta en 1 mL de hexano-diclorometano (7:3) antes de su inyección en el sistema cromatográfico. La concentración final de la disolución patrón inyectada fue de $1.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para todos los compuestos, excepto imazalil que fue de $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Los resultados indicaron recuperaciones aceptables (70-114%) para todos los compuestos, excepto o-fenilfenol (64% de recuperación), que debido a su alta volatilidad puede sufrir pérdidas durante los procesos de evaporación.

Optimización de la Etapa de Purificación

La optimización de la etapa de purificación incluyó el estudio de ciertas variables como tipo de fase estacionaria (diol, sílica y Florisil), la cantidad de sorbente utilizado (0.5 y 1 g), tipo de disolvente en el que se redisuelve el extracto para su introducción en el cartucho, tipo y volumen de eluyente. Estas experiencias se realizaron con disoluciones patrón y con extractos fortificados de muestras de naranja

Inicialmente, el estudio de purificación se realizó en cartuchos diol, de manera que fuese posible la aplicación de un método de purificación similar al desarrollado para la determinación de fungicidas seleccionados por LC. Ninguna de las pruebas realizadas con este tipo de cartucho condujo a resultados satisfactorios para la mayoría de los compuestos. Debido a que la purificación en cartuchos diol no permitió la recuperación satisfactoria de todos los fungicidas seleccionados, se planteó el estudio de la etapa de purificación en cartuchos de sílica y Florisil. Paralelamente, se decidió el empleo de un relleno de carbofrit en el *liner*, ya que el uso de este material durante la inyección de los extractos de muestra permite la obtención de cromatogramas más limpios.

Aunque en el presente trabajo no se ha realizado un estudio detallado sobre el uso de carbofrit, si que se ha evaluado su utilización como material de relleno en el liner del inyector con objeto de eliminar interferencias y prolongar la vida útil de la columna.

Para ello, a lo largo del proceso de optimización de la etapa de purificación, se realizaron repetidas inyecciones de extractos purificados de naranja fortificados a un nivel de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para imazalil), tanto con como sin carbofrit. Se comprobó que no se producía disminución en la respuesta de señal de los analitos, sino que por el contrario tenía lugar un aumento en el valor de las áreas de pico, sin que ello significara problemas de estabilidad de la señal. A modo de ejemplo, se muestran, en la Figura 2.30 los cromatogramas correspondientes a un extracto purificado de naranja con detección en modo SIM (3 iones seleccionados para cada compuesto) en donde se puede apreciar la diferencia de señal a la que se hace referencia con el empleo de carbofrit.

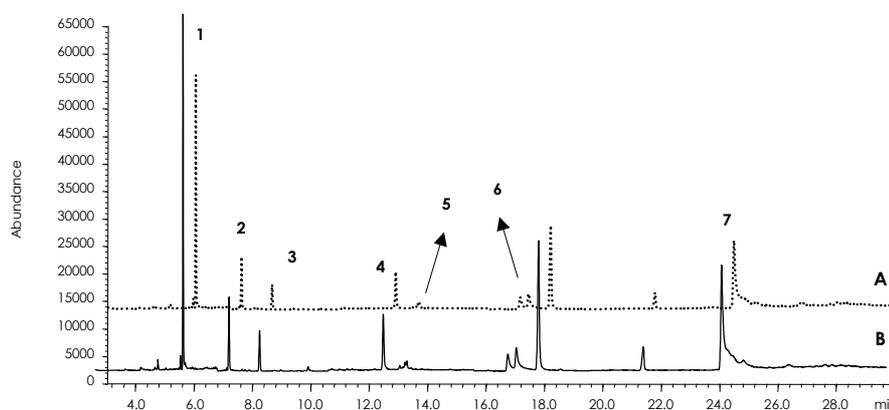


Figura 2.30. Cromatograma GC-MS (modo SIM) de un extracto de naranja fortificado a $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con OPP (1), dicloran (2), clorotalonil (3), tiabendazol (4), propiconazol (5), bitertanol (6) y $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de imazalil (5) inyectado sin carbofrit (A) y con carbofrit (B).

Tal como se recoge en la bibliografía [27, 28], es importante considerar aspectos como el número de inyecciones máximo a realizar sin reemplazar el relleno de carbofrit, así como el acondicionamiento del relleno. Así, se tuvo el cuidado de reemplazar este material después de aproximadamente 200 inyecciones, habiéndose comprobado durante este periodo la estabilidad de la señal mediante la inyección diaria de extractos de muestra fortificados.

El bloque de carbofrit se introdujo de forma manual hasta casi el fondo del *liner*, procediéndose antes de su instalación en el bloque de inyección al lavado de los extremos del *liner* con diclorometano para eliminar cualquier resto

del material que pudiera haberse desprendido, siendo posteriormente secado con corriente de nitrógeno. Para asegurar el correcto funcionamiento del sistema cromatográfico, se realizaban un máximo de cinco inyecciones de manera previa incluyendo la inyección de hexano, disolución hexánica de patrón de fungicidas y calibrado en matriz de naranjas y bananas respectivamente.

El reemplazo de carbofrit consistía en la reutilización del mismo bloque de relleno después de su re-acondicionamiento llevado a cabo mediante lavado con metanol, acetona y hexano, y sometido a estufa por lo menos durante 30 minutos a 100°C.

De esta manera, el estudio de la etapa de purificación mediante SPE en cartuchos de sílica y de Florisil, se llevó a cabo utilizando el relleno de carbofrit durante las inyecciones de los extractos de naranja purificados.

La evaluación de cartuchos de sílica (0.5 g) se realizó con extractos de naranja fortificados a varios niveles de concentración. Los cartuchos se cargaron con alícuotas de 5 mL de extracto. Se probaron cartuchos de 0.5 g y 1 g de sorbente, utilizando como disolución de elución hexano-acetona (al 30% y 50% de acetona). Previamente a la carga del extracto, se realizó el cambio de disolvente a hexano a partir de 5 mL de extracto contenidos en la disolución extractante (acetona, diclorometano, éter de petróleo y acetato de etilo).

Los resultados fueron similares tanto en cartuchos de 1 g como de 0.5 g, obteniéndose bajas recuperaciones de tiabendazol e imazalil (Tabla 2.18).

Tabla 2.18. Recuperación (%) de fungicidas en extracto de naranja fortificado a una concentración equivalente a 2 mg·Kg⁻¹, sometido a purificación por SPE en cartuchos de sílica (n=3).

Fungicidas	Sílica 0.5 g	Sílica 1g
	5 mL Hx:Ace (30%)	7 mL Hx:Ace (50%)
OPP	56	76
Dicloran	86	81
Clorotalonil	52 ⁽²⁾	69 ⁽²⁾
TBZ	33	32
Imazalil ⁽¹⁾	9	11
Propiconazol	89	94
Bitertanol	94	108

⁽¹⁾ 4 mg·Kg⁻¹ de imazalil

⁽²⁾ Se observaron pérdidas de clorotalonil durante la carga del extracto del orden de 5 y 16%, respectivamente

En cuanto a los cartuchos de Florisil, se tomaron 5 mL de extracto que fueron concentrados a casi sequedad y redisoluertos en 5 mL de hexano. Las pruebas de purificación se llevaron a cabo en cartuchos de Florisil de 0.5 g y de 1 g, usando para la elución hexano-acetona (al 30% y 50 % de acetona).

Los resultados obtenidos (Tabla 2.19) muestran que el empleo de una mayor cantidad de la fase estacionaria (1 g) permite una mejor retención de los compuestos, a la vez que la elución con un volumen de 7 mL de eluyente favorece el aumento de la recuperación de los fungicidas con respecto a 5 mL de eluyente, obteniéndose porcentajes de recuperación entre 67-104%.

Tabla 2.19. Recuperación (%) de fungicidas en extracto de naranja fortificado a una concentración equivalente a 2 mg·Kg⁻¹, sometido a purificación por SPE en cartuchos de Florisil (n=3).

Fungicidas	Florisil 0.5 g	Florisil 1g
	5 mL Hx:Ace (30%)	7 mL Hx:Ace (50%)
	R (%)	R (%)
OPP	58	73
Dicloran	60	71
Clorotalonil	42	67
TBZ	50	104
Imazalil ⁽¹⁾	70	73
Propiconazole	86	78
Bitertanol	94	73

⁽¹⁾ 4 mg·Kg⁻¹ de imazalil

A la vista de los resultados obtenidos se decidió el empleo de cartuchos Florisil de 1 g, ya que las recuperaciones obtenidas para todos los analitos fueron satisfactorias (entre 70 y 110%). Este mismo procedimiento se utilizó también para la purificación de extractos de banana.

El procedimiento de purificación seleccionado y que debe ser validado es el que se muestra en la Figura 2.31.

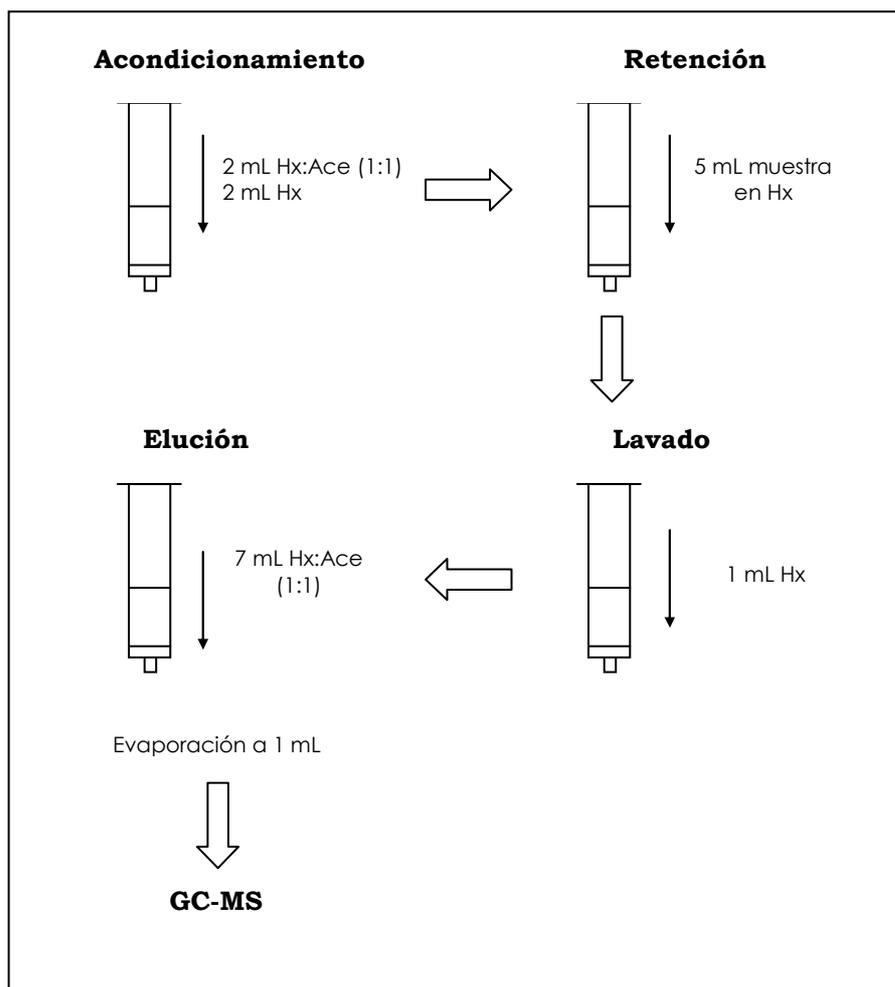


Figura 2.31. Esquema del procedimiento recomendado para la purificación de extractos de naranja y banana mediante cartuchos de Florisil de 1 g.

A modo de ejemplo, en la Figura 2.32 se presenta un cromatograma en modo SIM (3 iones seleccionados) correspondiente a un extracto de naranja fortificado a un nivel de concentración equivalente a $2 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ con los fungicidas seleccionados y procesado de acuerdo a las condiciones de extracción y purificación optimizadas.

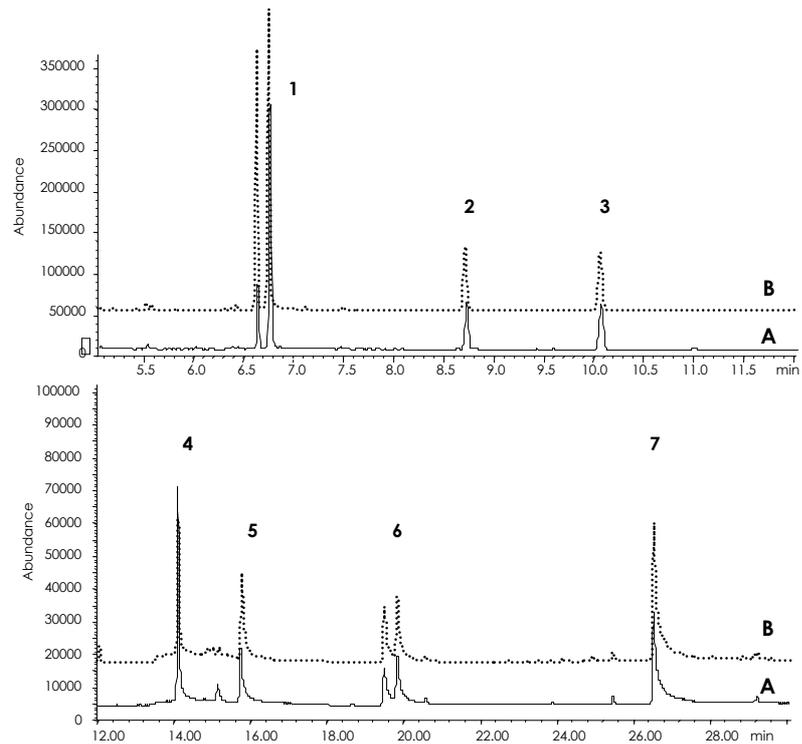


Figura 2.32. Cromatogramas GC-MS (modo SIM) correspondientes a (A) un extracto de naranja fortificado a una concentración equivalente a $2 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de OPP (1), dicloran (2), clorotalonil (3), tiabendazol (4), propiconazol (6), bitertanol (7) y $4 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de imazalil (5), y (B) disolución patrón de la misma concentración preparado en matriz.

Procedimiento Recomendado

En resumen, el procedimiento recomendado para la determinación de fungicidas seleccionados en muestras de bananas y naranjas es el siguiente:

- 10 g de muestra fresca de naranja o banana triturada se extraen con 20 mL de acetona y 40 mL de una mezcla de diclorometano-éter de petróleo (1:1), y homogeneizada con Ultraturrax durante 3 minutos. Seguidamente, se adiciona 40 mL de acetato de etilo y se homogeneiza nuevamente en Ultraturrax durante 3 minutos. El homogeneizado es filtrado a través de papel filtro conteniendo 10 g de sulfato de sodio

anhidro y se recoge el extracto en un matraz aforado para su posterior enrase con acetato de etilo a un volumen de 100 mL. Una alícuota de 5 mL de extracto es concentrada a 2 mL con calentamiento en un baño de agua a 40°C y con corriente de nitrógeno, se adiciona 2 mL de hexano y se continúa concentrando hasta un volumen de 0.5 mL. Finalmente el extracto es llevado a 2 mL con adición de hexano.

- Después de la extracción, se procede a la purificación del extracto mediante SPE en cartucho de Florisil (1 g). Los cartuchos son acondicionados haciendo pasar a través del mismo, 2 mL de hexano-acetona (1:1) y hexano. Sin dejar que los cartuchos se sequen, se carga el extracto de muestra (5 mL), se lava el cartucho con 1 mL de hexano y se deja secar durante un período de 15 minutos. Los analitos son posteriormente eluidos con una disolución de 7 mL de hexano-acetona (1:1) recogiendo el eluato en un tubo graduado. El extracto obtenido es llevado a 1 mL de volumen final mediante concentración en un baño de agua a 40°C y con corriente de nitrógeno. Un volumen de 2 μ L son inyectados en el sistema GC-MS.

En los esquemas de las Figuras 2.33 y 2.34 se refleja las condiciones del método recomendado.

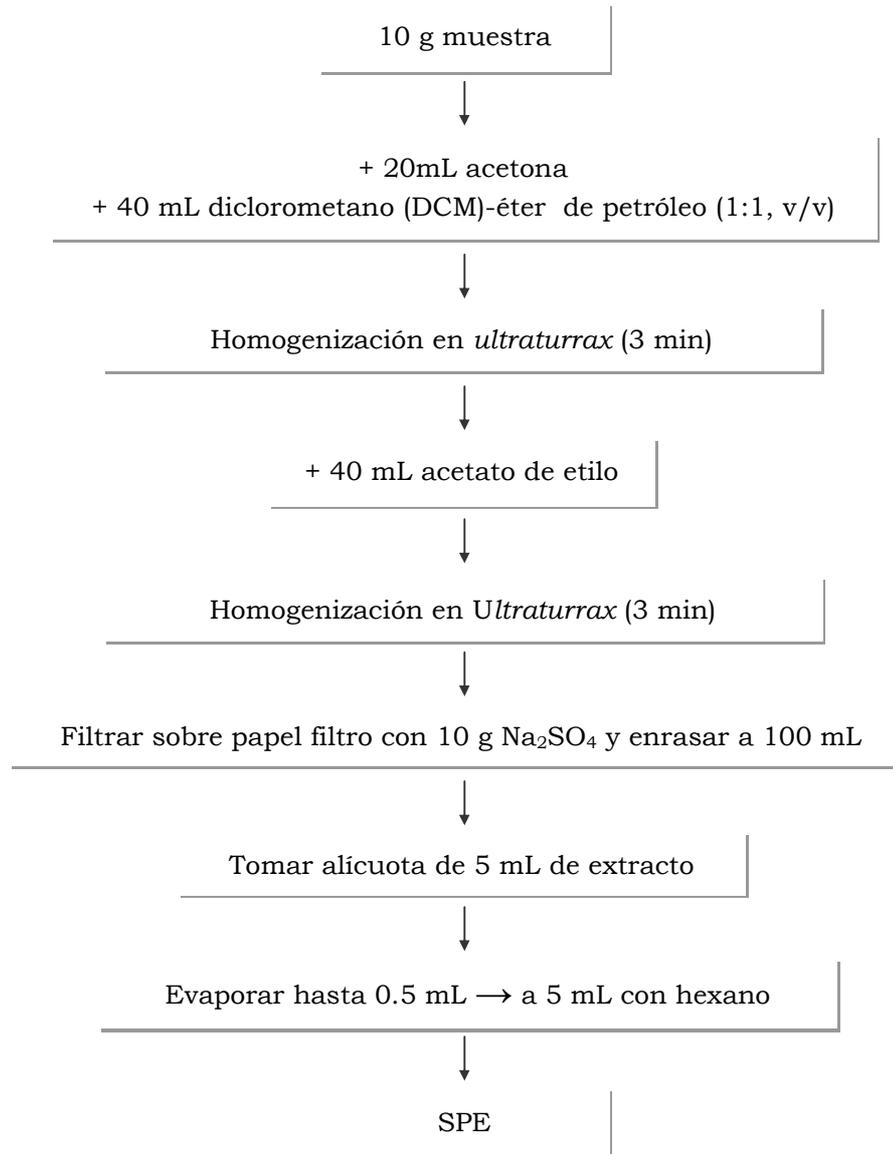


Figura 2.33 Esquema del procedimiento aplicado para la etapa de extracción de fungicidas en muestras de naranja y banana.

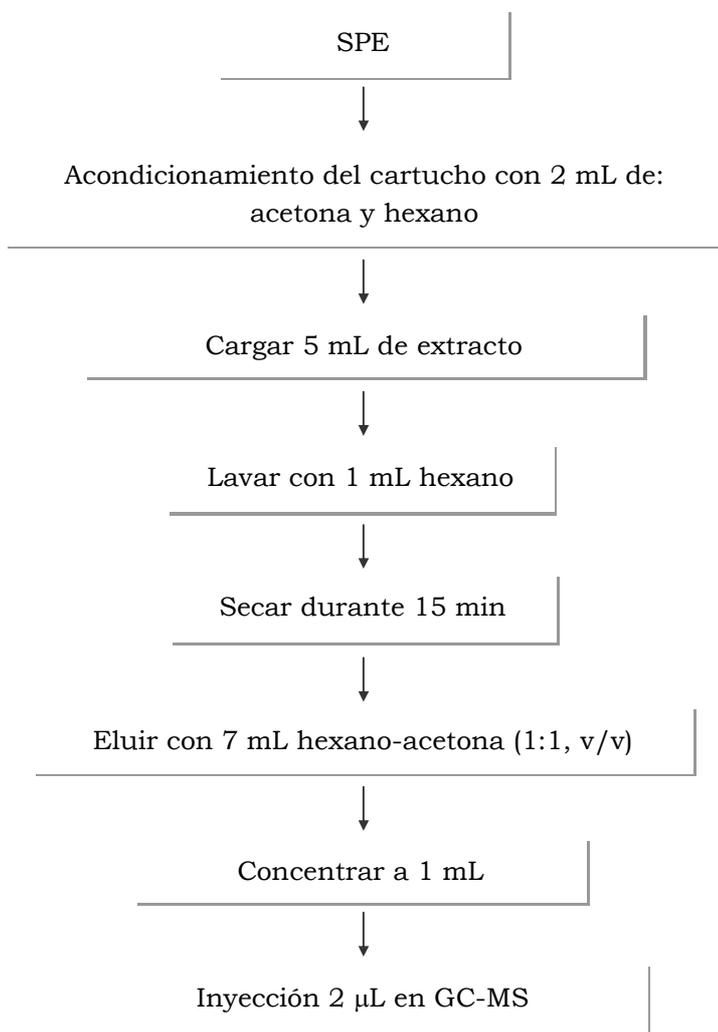


Figura 2.34. Esquema del procedimiento aplicado para la etapa de purificación de extractos de naranja y banana.

2.3.3. Validación del Método de Análisis

Una vez optimizadas las etapas de extracción y purificación, se procedió a la validación del método completo de análisis, estudiándose la linealidad, exactitud y precisión, a partir de muestras fortificadas de naranjas y bananas.

Linealidad

Comparando la inyección de disoluciones patrón preparadas en blanco de muestra con disoluciones patrón preparadas en hexano, se comprobó un aumento en las áreas de pico en presencia de matriz (Figura 2.35), por lo cual se decidió llevar a cabo la cuantificación de las muestras mediante calibrado en matriz, con objeto de minimizar errores en la cuantificación originados por el efecto matriz.

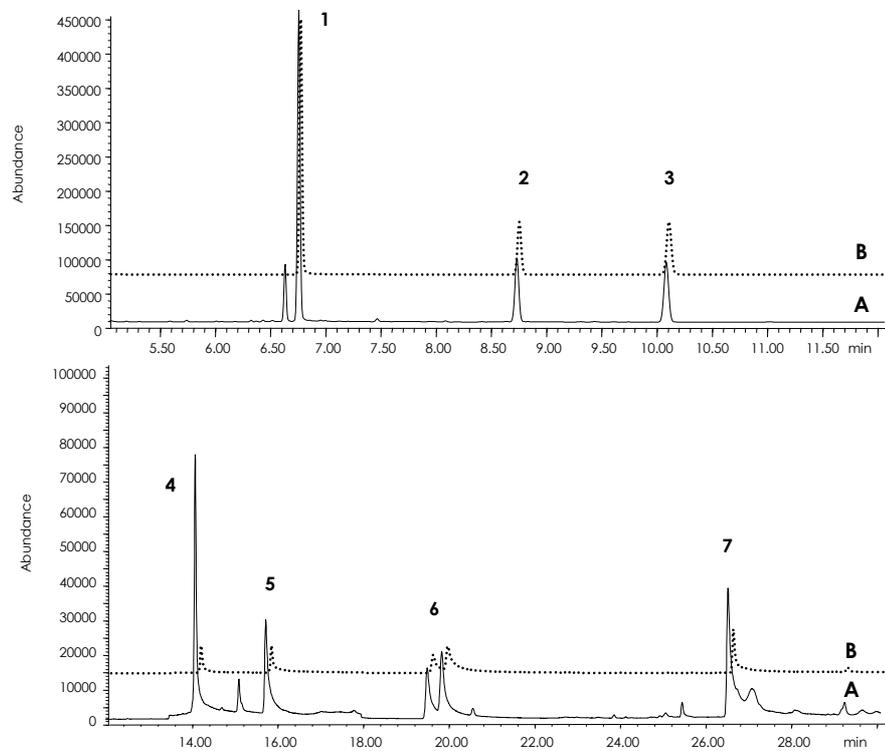


Figura 2.35. Cromatogramas GC-MS (modo SIM) de (A) un patrón en matriz correspondiente a $2 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de OPP (1), dicloran (2), clorotalonil (3), tiabendazol (4), propiconazol (6), bitertanol (7) y $4 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de imazalil (5), y (B) de una disolución patrón en hexano de concentración equivalente ($1\text{-}2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

El calibrado en matriz se preparó a 7 niveles de concentración, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 4 mg·Kg⁻¹, (excepto imazalil que fue siempre el doble). Para ello, extractos blanco de naranja y banana fueron purificados y evaporados hasta sequedad. La reconstitución de los extractos se realizó con 1 mL de las distintas disoluciones hexánicas de patrón de concentración adecuada para conseguir los niveles de concentración del calibrado. Estas disoluciones patrón fueron estables conservadas en frigorífico durante al menos una semana.

Las curvas del calibrado en matriz, tal como se muestra en las Figuras 2.36 y 2.37, tanto para naranjas como para bananas, fueron obtenidas mediante detección en modo *extract ion*.

En ambos tipos de muestra, la linealidad para o-fenilfenol, dicloran y clorotalonil se ajustó a ecuaciones de primer orden con coeficientes de correlación superiores a 0.996, mientras que para TBZ, imazalil, propiconazol y bitertanol las curvas de calibración se ajustaron a ecuaciones de segundo orden, obteniendo coeficientes de correlación superiores a 0.997 para los rangos de concentración ensayados. Las Tablas 2.20 y 2.21 muestran las ecuaciones de las curvas para cada compuesto.

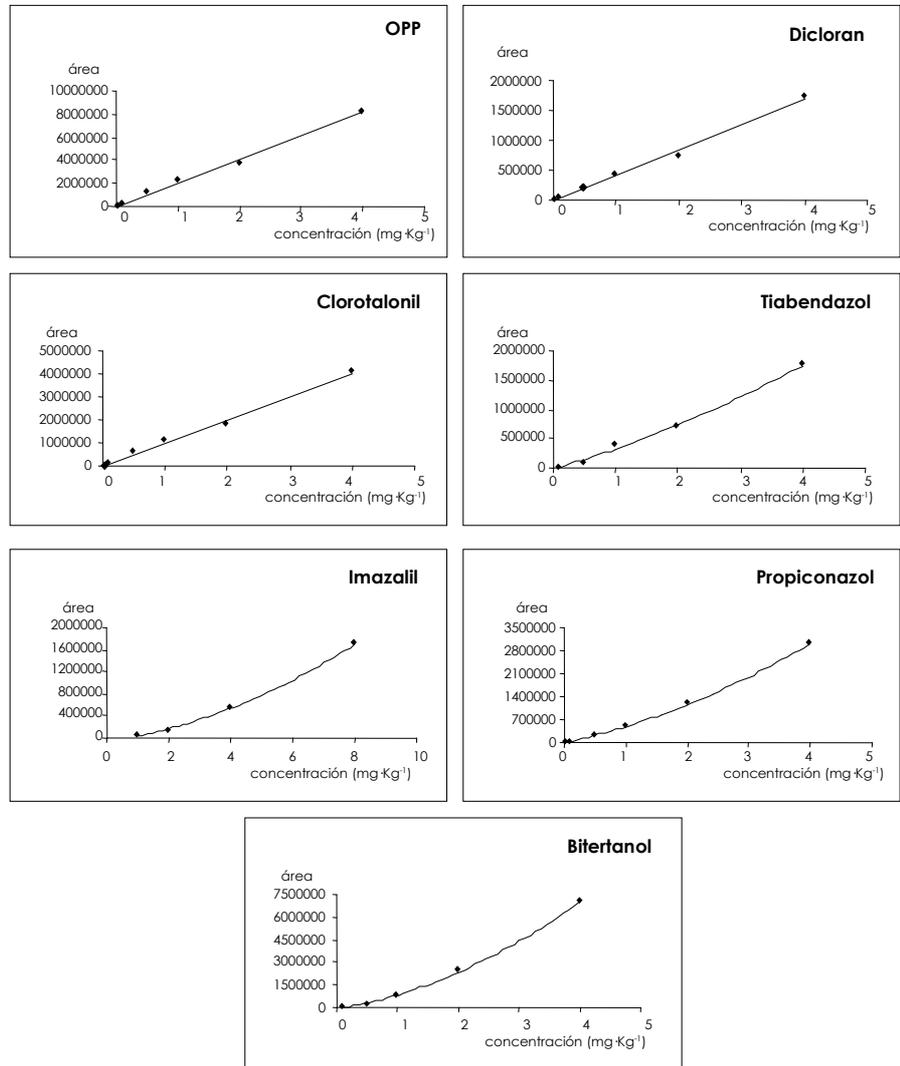


Figura 2.36. Curvas de calibrado correspondientes a la determinación de los fungicidas seleccionados en naranja mediante GC-MS.

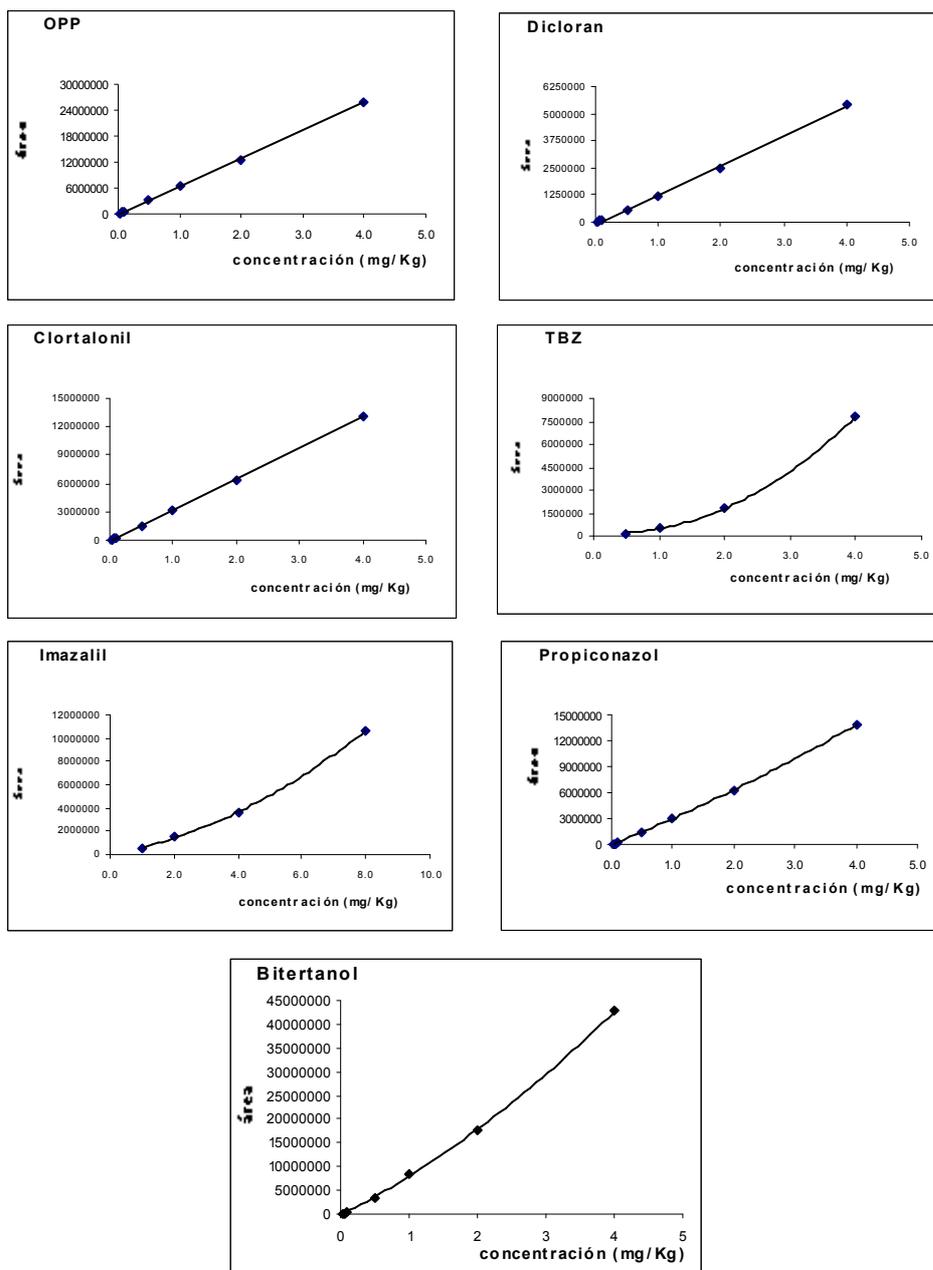


Figura 2.37. Curvas de calibrado correspondientes a la determinación de los fungicidas seleccionados en bananas mediante GC-MS.

Tabla 2.20. Estudio de la linealidad para la determinación de los fungicidas seleccionados en naranjas mediante GC-MS.

Fungicidas	Rango de concentración (mg·Kg ⁻¹)	r	Ecuación
OPP	0.02 - 4.0	0.9977	y=4041340.3x+53839.2
Dicloran	0.02 - 4.0	0.9972	y=857339.64x-18829.3
Clorotalonil	0.02 - 4.0	0.9966	y=2005145.0x+18641.3
TBZ	0.1 - 4.0	0.9975	y=131308.8x ² +617837.9x-18978.8
Imazalil	1.0 - 8.0	0.9994	y=70613.0x ² +157595.0x-60677.3
Propiconazol	0.02 - 4.0	0.9997	y=319791.9x ² +869859.8x-28072.5
Bitertanol	0.02 - 4.0	0.9999	y=957797.8x ² +575351.9x-16458.9

Tabla 2.21. Estudio de la linealidad para la determinación de los fungicidas seleccionados en bananas mediante GC-MS.

Fungicidas	Rango de concentración (mg·Kg ⁻¹)	r	Ecuación
OPP	0.02 - 4.0	0.9997	y=12858376.9x-52662.3
Dicloran	0.02 - 4.0	0.9988	y=2679884.2x-74611.6
Clorotalonil	0.02 - 4.0	0.9997	y=6561728.2x-77468.0
TBZ	0.5 - 4.0	0.9999	y=2233173.9x ² -694084.1x+256781.0
Imazalil	1.0 - 8.0	0.9997	y=421711.2x ² +98115.8x-8277.1
Propiconazol	0.02 - 4.0	1.0000	y=603573.9x ² +5744135.4x-42533.7
Bitertanol	0.02 - 4.0	0.9998	y=334836.7x ² +14710932.6x-142013.7

Se observó en el caso de propiconazol y bitertanol que para rangos de concentración más pequeños las respuestas se ajustaban a ecuaciones de primer orden con coeficientes de correlación de 0.99. A modo de ejemplo, en la Tabla 2.22 se muestran las ecuaciones obtenidas para estos dos compuestos a distintos intervalos de concentración ensayados para el calibrado en matriz de naranja. En el caso de bananas, las respuestas de linealidad fueron similares.

Para la cuantificación de las muestras analizadas se han utilizado estos calibrados más reducidos, con 3 puntos, de modo que los resultados fueron calculados en base a las ecuaciones de primer orden para o-fenilfenol, dicloran, clorotalonil, propiconazol y bitertanol. Tiabendazol e imazalil fueron calculados con los calibrados de segundo orden.

Tabla 2.22. Linealidad del calibrado en matriz de naranja para propiconazol y bitertanol en intervalos de concentración reducidos.

Fungicidas	Rango de concentración (mg·Kg ⁻¹)	r	Ecuación
Propiconazol	0.02 - 0.5	0.9955	y=782733.9x-10731.0
	0.1 - 1.0	0.9977	y=977838.2x-40456.4
	1.0 - 4.0	0.9989	y=1700950.1x-439441.0
Bitertanol	0.02 - 0.5	0.9995	y=774433.7x-5485.8
	1.0 - 4.0	0.9968	y=4201040.3x-1522533.5

Exactitud

La exactitud se estimó mediante ensayos de recuperación analizando muestras fortificadas (n=5) a diferentes niveles de concentración y para ambas matrices. Para el caso de o-fenilfenol, dicloran, clorotalonil, propiconazol y bitertanol se ensayaron tres niveles (0.05, 0.5 y 2 mg·Kg⁻¹), mientras que para tiabendazol e imazalil fueron dos los niveles de concentración ensayados (0.5 y 2 mg·Kg⁻¹, y 1 y 4 mg·Kg⁻¹, respectivamente).

Los valores de recuperación obtenidos para todos los compuestos estudiados se muestran en las Tablas 2.23 y 2.24, junto con los respectivos valores de desviación estándar. Las recuperaciones obtenidas fueron satisfactorias para TBZ, imazalil, propiconazol y bitertanol en las dos matrices, obteniéndose resultados generalmente en el rango de 70-110% con desviaciones estándar inferiores al 14% en el caso de naranjas y al 8% en bananas. En el caso de dicloran y clorotalonil las recuperaciones fueron ligeramente inferiores en ambas matrices con valores medios entre 50-90% (dicloran) y 50-70% (clorotalonil) y con coeficientes de variación inferiores al 11% en todos los casos.

Tal como se esperaba, los valores de recuperación de o-fenilfenol no fueron del todo satisfactorios debido principalmente a problemas de pérdidas durante las etapas de evaporación en el método, obteniéndose mejores resultados en el caso de naranjas (entre el 51 y 72%) con valores de coeficiente de variación inferiores al 8%. En bananas las recuperaciones fueron ≤50% para todos los niveles de fortificación ensayados.

Tabla 2.23. Recuperación (%) y desviación estándar relativa para la determinación de los fungicidas seleccionados en muestras fortificadas de naranja (n=5) mediante GC-MS.

Fungicidas	Nivel de fortificación (mg·Kg ⁻¹)			LOQ (mg·Kg ⁻¹)	LOD (mg·Kg ⁻¹)
	0.05	0.5	2		
OPP	72 (8)	51 (6)	70 (4)	0.05	0.01
Dicloran	89 (5)	59 (4)	66 (5)	0.05	0.025
Clorotalonil	70 (7)	52 (3)	64(7)	0.05	0.01
Tiabendazol	-	107 (9)	112 (8)	0.5	0.1
Propiconazol	112 (2)	72 (5)	78 (3)	0.05	0.05
Bitertanol	117 (3)	84 (9)	76 (7)	0.05	0.05
	1		4		
Imazalil	79 (14)		75 (4)	1.0	0.25

Las RSD se muestran entre paréntesis

Tabla 2.24. Recuperación (%) y desviación estándar relativa para la determinación de los fungicidas seleccionados en muestras fortificadas de banana (n=5) mediante GC-MS.

Fungicidas	Nivel de fortificación (mg·Kg ⁻¹)			LOQ (mg·Kg ⁻¹)	LOD (mg·Kg ⁻¹)
	0.05	0.5	2		
OPP	<40 (11)	45 (12)	50 (4)	0.05	0.007
Dicloran	86 (5)	63 (4)	61 (2)	0.05	0.015
Clorotalonil	62 (11)	51 (10)	53 (9)	0.05	0.005
Tiabendazol	-	104 (4)	87 (7)	0.5	0.1
Propiconazol	109 (6)	77 (7)	77 (4)	0.05	0.03
Bitertanol	117 (4)	94 (8)	78 (3)	0.05	0.01
	1		4		
Imazalil	82 (7)		69 (8)	1.0	0.2

Las RSD se muestran entre paréntesis

Tabla 2.25. Precisión intermedia (%) para la determinación de los fungicidas seleccionados en muestras fortificadas de naranja y banana mediante GC-MS

Fungicidas	Nivel de fortificación (mg·Kg ⁻¹)					
	0.05			0.5		
	Naranjas (n=9)			Bananas (n=6)		
OPP	13	16	12	16	11	8
Dicloran	11	15	9	7	5	5
Clorotalonil	10	11	12	11	14	14
Tiabendazol	-	9	8	-	4	3
Propiconazol	16	14	7	5	8	4
Bitertanol	3	10	8	4	8	6
	1		4	1		4
Imazalil	14		11	7		6

En la Tabla 2.25 se indica la precisión intermedia del método, tanto para naranjas (n=9) como para bananas (n=6), con valores de RSD inferiores al 16%, demostrando la aceptable reproducibilidad del método para la determinación de todos los fungicidas estudiados, incluyendo el o-fenilfenol.

Los límites de detección (LOD) se han calculado como la concentración correspondiente a un pico tres veces mayor al ruido de fondo, a partir de los cromatogramas de las muestras fortificadas al nivel más bajo ensayado para cada analito. Los resultados se muestran en las Tablas 2.23 y 2.24, pudiendo apreciarse que los LOD estimados en bananas fueron ligeramente más bajos que en naranjas. Los límites de cuantificación (LOQ), obtenidos como las concentraciones más bajas a las cuales se validó el método para cada analito, también se muestran en las Tablas 2.23 y 2.24. Se puede observar que el método permite la cuantificación de la mayoría de los fungicidas estudiados al nivel de $0.05 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (o-fenilfenol, dicloran, clorotalonil, propiconazol, bitertanol) en ambos tipos de muestra. La cuantificación de tiabendazol sería posible hasta el nivel de $0.5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, y el valor más elevado correspondería a imazalil que sólo podría ser cuantificado de modo aceptable a niveles iguales o superiores a $1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Estos valores permiten determinar los analitos a nivel de los límites máximos de residuos (LMR) establecidos por la legislación europea y por la EPA, e incluso a valores de concentración inferiores. Únicamente, en el caso de dicloran en bananas el LOQ es ligeramente superior al LMR establecido por la legislación europea ($0.01 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$).

De un modo estricto, y de acuerdo con las guías SANCO de la UE [32], para aceptar estos valores de LOQ sería necesario que las recuperaciones fueran satisfactorias al nivel más bajo ensayado (70-110%) y las precisiones aceptables (<15%). Este segundo criterio se cumple en todos los casos, pero no así el criterio para las recuperaciones. Por ello, los valores de LOQ presentados en las Tablas 2.23 y 2.24 podrían aceptarse para o-fenilfenol, dicloran, clorotalonil, tiabendazol e imazalil en naranjas, sin embargo, debería tenerse en cuenta que las recuperaciones para propiconazol y bitertanol han sido ligeramente superiores al valor máximo aceptado normalmente (110%).

En el caso de bananas, los LOQ cumplen el criterio establecido para dicloran, tiabendazol, propiconazol e imazalil. Sin embargo, la recuperación al

nivel del LOQ fue del 117% para bitertanol, e inferior al 70% para o-fenilfenol (<40%) y clorotalonil (62%).

La selectividad se basó en la selección apropiada de iones para la detección de cada analito mediante MS en modo SIM. La especificidad del método se evaluó satisfactoriamente mediante comparación de un blanco de procedimiento, un blanco de muestra y un blanco de muestra fortificado al nivel de LOQ, preparados e inyectados de acuerdo a las condiciones optimizadas. A modo de ejemplo, en las Figuras 2.38 a 2.41, se presentan cromatogramas de muestras fortificadas al nivel del LOQ para cada analito, tanto en bananas como en naranjas.

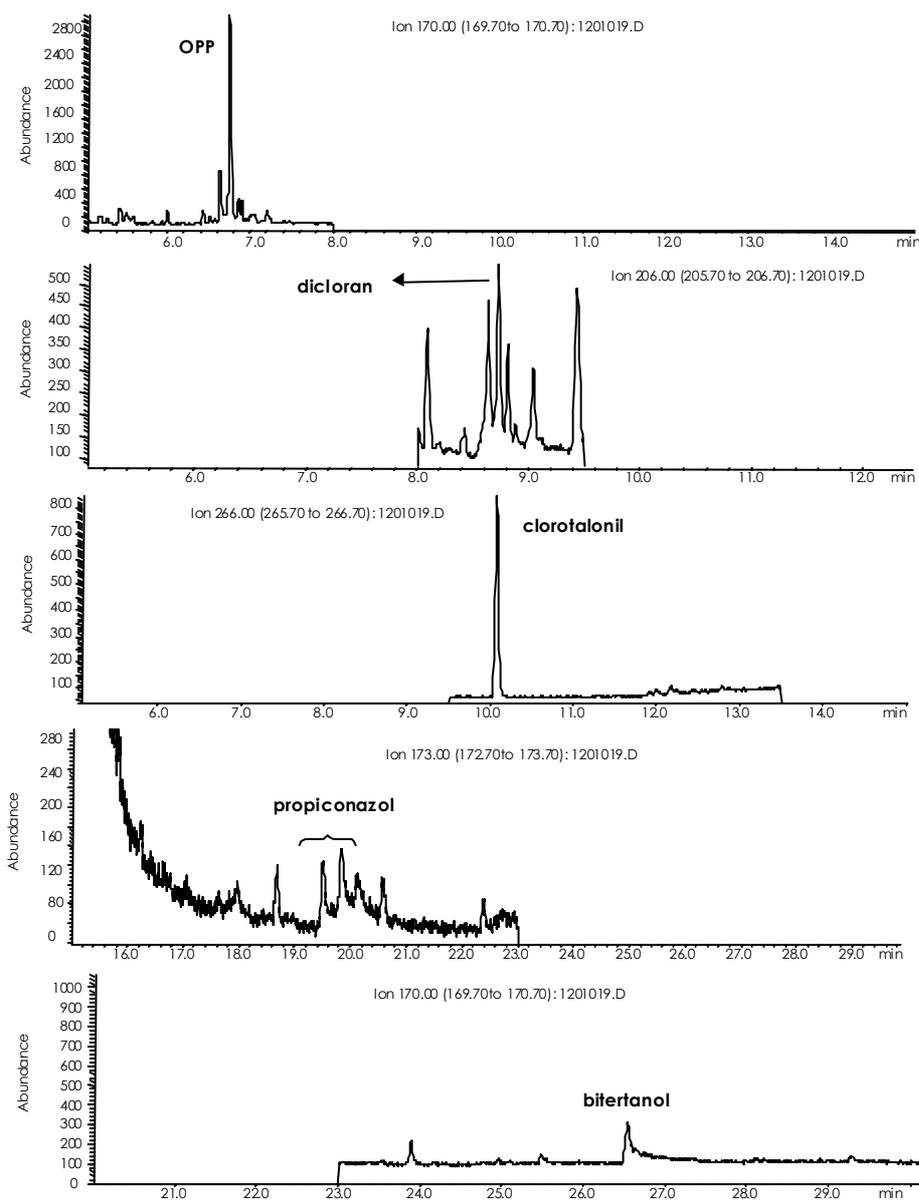


Figura 2.38. Cromatogramas GC-MS (extract ion) correspondientes a una muestra de naranja fortificada a $0.05 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ con OPP, dicloran, clorotalonil, propiconazol, bitertanol

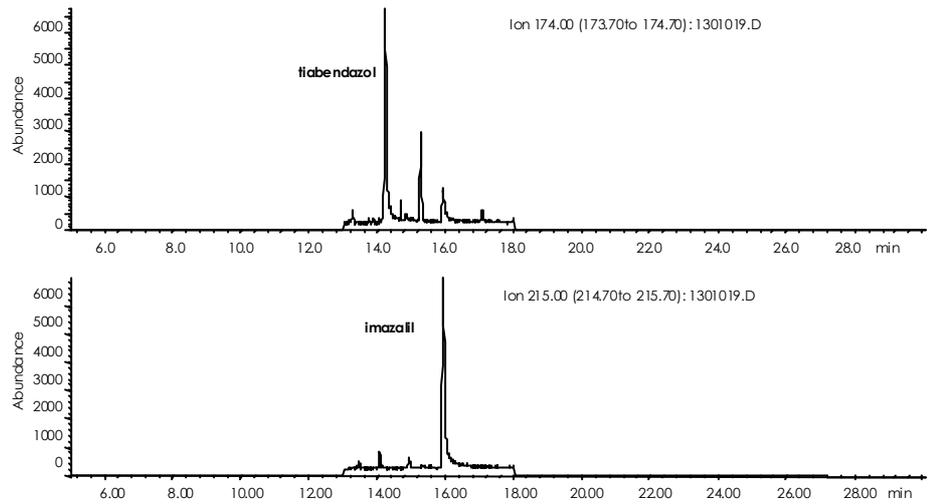


Figura 2.39. Cromatogramas GC-MS (extract ion) correspondientes a una muestra de naranja fortificada a $0.5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de tiabendazol y $1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ imazalil.

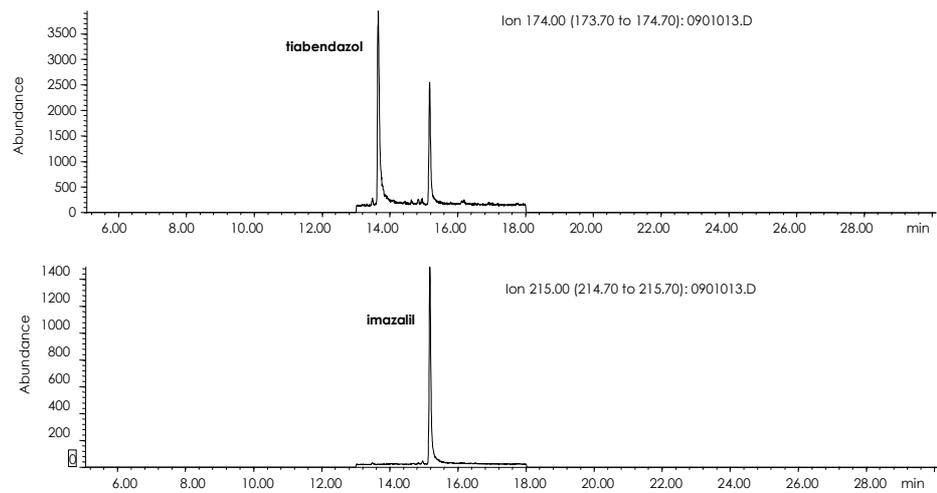


Figura 2.40. Cromatogramas GC-MS (extract ion) correspondientes a una muestra de banana fortificada a $0.5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ con tiabendazol y $1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ imazalil.

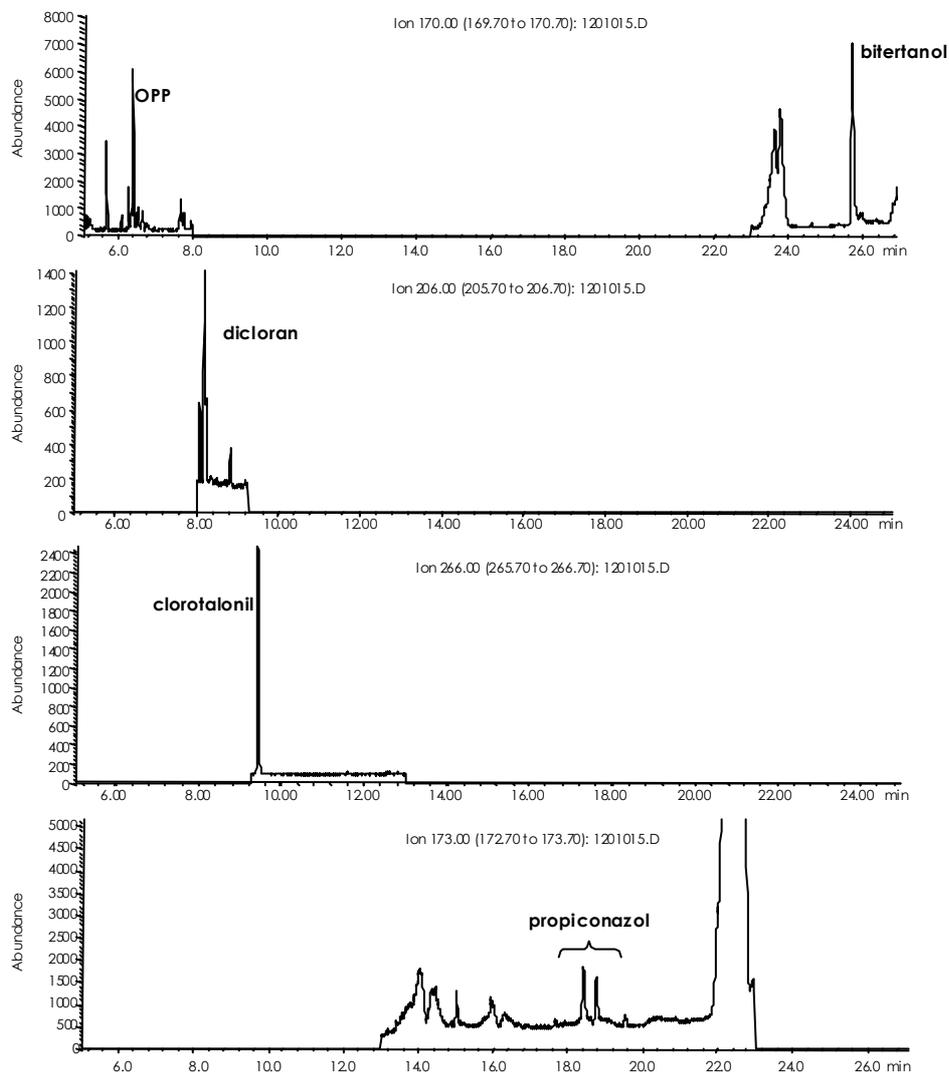


Figura 2.41. Cromatogramas GC-MS (extract ion) correspondientes a una muestra de naranja fortificada a $0.05 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ con OPP, dicloran, clorotalonil, propiconazol, bitertanol

2.3.4. Aplicación a Muestras Reales

El procedimiento desarrollado se ha aplicado a muestras reales de naranjas y bananas, las cuales ya fueron analizadas utilizando el método LC-DAD/FD descrito en el apartado anterior. En el citado apartado también ha sido descrita la identificación de las muestras reales.

En la Tabla 2.26 se muestran los resultados obtenidos para las muestras de naranja, comprobándose la detección de o-fenilfenol, tiabendazol e imazalil en la mayoría de las muestras de naranja analizadas. Los resultados obtenidos indican valores de concentración entre 0.1-1.8 mg·Kg⁻¹ de o-fenilfenol, 0.5-6.8 mg·Kg⁻¹ de tiabendazol y 1.0-7.1 mg·Kg⁻¹ de imazalil, encontrándose todas las muestras por debajo de los límites máximos de residuos establecidos por la legislación para el control de estos fungicidas en naranja, exceptuando la muestra 1, la cual excedió los 5.0 mg·Kg⁻¹ fijados para tiabendazol e imazalil.

Tabla 2.26. Concentración de fungicidas en muestras reales de naranja obtenidas mediante aplicación del método GC-MS

Muestras	Concentración (mg·Kg ⁻¹)		
	o-Fenilfenol ⁽¹⁾	Tiabendazol	Imazalil
Naranja 1	1.77	6.8	7.1
Naranja 2	1.08	1.6	1.6
Naranja 3	1.22	2.5	2.3
Naranja 4	0.87	2.1	3.2
Naranja 5	0.50	1.3	2.2
Naranja 6	n.d.	< 0.5	1.0
Naranja 7	n.d.	1.5	1.6
Naranja 8	n.d.	< 0.5	1.9
Naranja 9	n.d.	< 0.5	1.2
Naranja 10	0.12	1.3	1.8
Naranja 11	0.60	< 0.5	2.2
Naranja 12	n.d.	< 0.5	< 1
Naranja 13	0.42	< 0.5	< 1

n.d., no detectado

⁽¹⁾ Concentraciones estimadas sin aplicar factor de corrección debido a la recuperación

En el caso de muestras de bananas, y tal como se indica en la Tabla 2.27, se detectó la presencia de tiabendazol, imazalil y bitertanol en algunas de las muestras analizadas, siendo cuantificables los valores de tiabendazol en el orden de 0.5 mg·Kg⁻¹ y bitertanol en el orden de 0.17-0.48 mg·Kg⁻¹. Las concentraciones de imazalil fueron inferiores al LOQ en todas las muestras. En

ninguno de los casos se superan los niveles establecidos como límites máximos de residuos para estos fungicidas en bananas.

Tabla 2.27. Concentración de fungicidas en muestras reales de banana obtenidas mediante aplicación del método GC-MS

Muestras	Concentración ($\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$)		
	Tiabendazol	Imazalil	Bitertanol
Banana 1	n.d.	n.d.	n.d.
Banana 2	n.d.	n.d.	n.d.
Banana 3	n.d.	n.d.	n.d.
Banana 4	n.d.	n.d.	0.17
Banana 5	n.d.	n.d.	n.d.
Banana 6	0.5	< 1	n.d.
Banana 7	0.5	< 1	n.d.
Banana 8	n.d.	n.d.	0.48
Banana 9	n.d.	n.d.	0.26

n.d., no detectado

La confirmación de los fungicidas detectados se comprobó a partir de los espectros de masas registrados en modo SIM (tres iones por compuesto) verificándose que las abundancias relativas entre los iones eran semejantes a las de los patrones. A modo de ejemplo, se muestran en las Figuras 2.42 y 2.43 cromatogramas de muestras reales de banana y naranja con los correspondientes espectros de masas seleccionados.

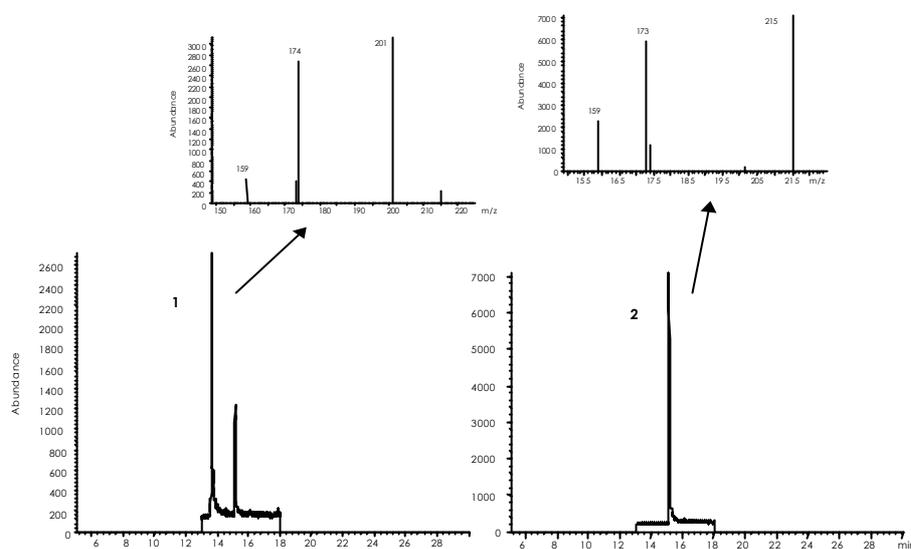


Figura 2.42. Cromatograma GC-MS (extract ion) para una muestra real de banana (número 7), detectándose la presencia de 1) TBZ ($0.51 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$), 2) imazalil ($<1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$)

En las Figuras 2.44 a 2.46 se muestran, de forma gráfica, las concentraciones de fungicidas encontrados y se comparan con los LMR vigentes.

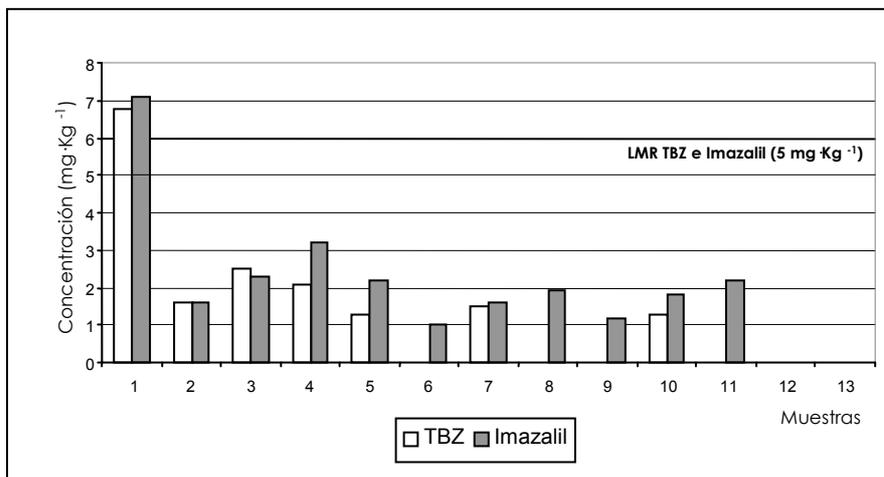


Figura 2.44. Resultados del análisis de muestras reales de naranjas con respecto a tiabendazol e imazalil (método GC-MS).

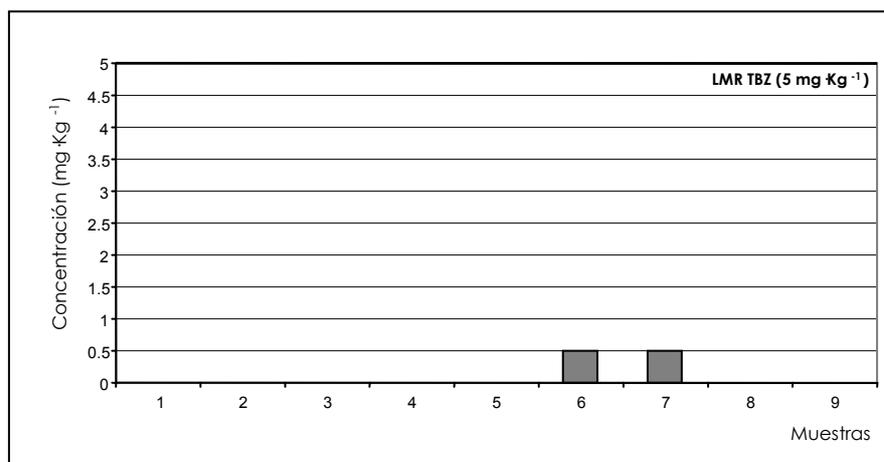


Figura 2.45. Resultados del análisis de muestras reales de bananas con respecto a de tiabendazol (método GC-MS).

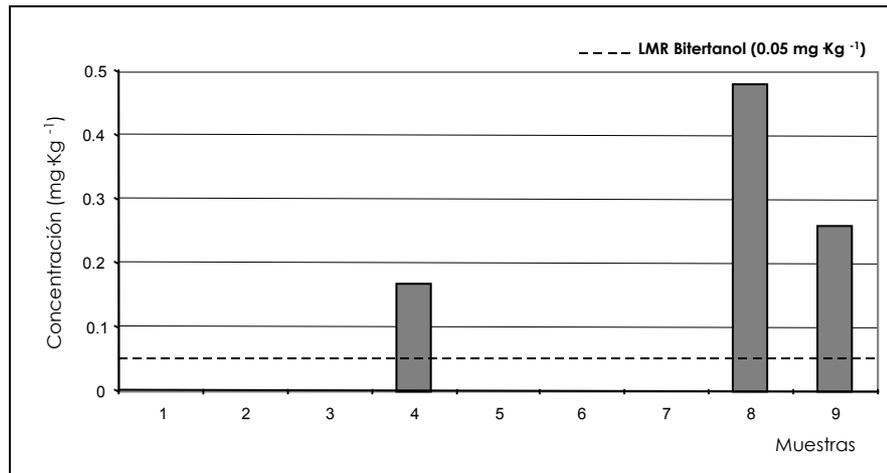


Figura 2.46. Resultados del análisis de muestras reales de bananas con respecto a de bitertanol (método GC-MS).

2.3.5. Confirmación Mediante Cromatografía de Gases con Detección por Espectrometría de Masas (GC-MS/MS)

Adicionalmente al análisis de muestras reales mediante GC-MS, los resultados obtenidos en las muestras analizadas fueron confirmados mediante GC-MS/MS (trampa de iones), técnica capaz de aumentar la sensibilidad y selectividad de los métodos analíticos, proporcionando mayor relación señal/ruido para los picos cromatográficos correspondientes.

La espectrometría de iones en tandem consiste en el aislamiento del ión precursor seleccionado para cada compuesto dentro de la trampa, y seguidamente la aplicación de un voltaje de excitación adecuado para su subsecuente fragmentación. El método MS/MS optimizado para la determinación de residuos de fungicidas se muestra en la Tabla 2.28. Por lo que respecta a la cuantificación, los iones seleccionados de los espectros EI-MS/MS también se muestran en la Tabla 2.28.

Cabe destacar que en este apartado únicamente se procedió a la optimización del método cromatográfico MS/MS, sin llegarse a validar el procedimiento completo de análisis, ya que esta técnica se aplicó principalmente con fines de confirmación de los residuos detectados.

Tabla 2.28. Condiciones para la detección por MS/MS de los fungicidas seleccionados

Compuesto	Ion Precursor	Tiempo (min)	Ventana	Rango masas	Voltaje (V)	Iones de cuantificación
OPP	170	3.50	4	100-176	1.50	115, 141
Dicloran	176	6.80	4	100-180	1.90	148, 150
Clorotalonil	266	8.00	5	110-275	3.50	170, 160
Tiabendazol	201	12.00	3	120-210	1.15	174
Imazalil	215	13.90	4	135-222	1.05	173
Propiconazol	259	16.40	4	125-265	1.20	173, 191
Bitertanol	170	24.00	3	100-175	1.55	115, 141

Los mismos extractos de las muestras analizadas por GC-MS, después de un período de almacenamiento en congelación (-18°C), fueron analizados por GC-MS/MS. Únicamente la muestra Naranja 2 no pudo ser analizada por MS/MS debido al escaso volumen disponible de extracto. Las concentraciones estimadas en los dos tipos de matriz se recogen en la Tabla 2.29.

Tabla 2.29. Concentración estimada (mg·Kg⁻¹) de fungicidas en muestras reales analizadas mediante GC-MS/MS

Naranjas			Bananas				
	<i>o</i> -Fenilfenol	Tiabendazol	Imazalil		Tiabendazol	Imazalil	Bitertanol
1	1.6	5.6	6.7	1	n.d.	nd	n.d.
2	-	-	-	2	n.d.	0.4	n.d.
3	1.2	2.1	2.0	3	n.d.	n.d.	n.d.
4	0.6	2.2	4.8	4	n.d.	n.d.	0.2
5	0.4	1.6	3.8	5	n.d.	n.d.	n.d.
6	n.d.	0.8	2.3	6	0.5	0.4	n.d.
7	n.d.	1.8	2.7	7	0.4	0.5	n.d.
8	n.d.	0.7	3.2	8	n.d.	n.d.	0.3
9	n.d.	0.6	2.4	9	n.d.	n.d.	0.3
10	0.2	1.5	3.6				
11	0.4	0.8	3.7				
12	n.d.	0.6	1.7				
13	0.4	0.6	2.3				

n.d., no detectado

Cabe indicar que, mediante el análisis de las muestras fortificadas al nivel del LOQ del método GC-MS para cada analito, se estimaron límites de detección más bajos para todos los compuestos, tanto en naranjas como en bananas. En el caso específico de tiabendazol e imazalil los límites de detección estimados fueron aproximadamente la mitad que con el equipo de cuadrupolo, por lo que

ha sido posible indicar datos de concentración en muestras reales que no fue posible hacerlo mediante detección con GC-MS (Tabla 2.29).

Más adelante, en el apartado de 4.3 se realiza una discusión comparada y crítica de los resultados obtenidos por ambas técnicas.

A modo de ejemplo, se muestran en las Figuras 2.47 y 2.48 los cromatogramas obtenidos para las muestras banana 6 y naranja 13, en las cuales se determinó y cuantificó la presencia de tiabendazol, imazalil y o-fenilfenol.

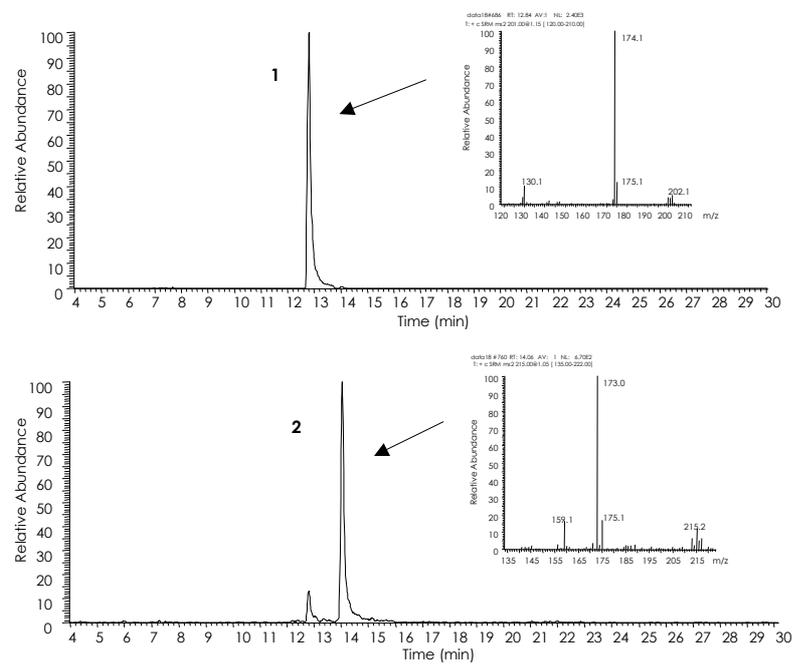


Figura 2.47. Cromatogramas GC-MS/MS correspondientes a la muestra banana 6, detectándose presencia de (1) TBZ ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$) y (2) imazalil ($0.4 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$)

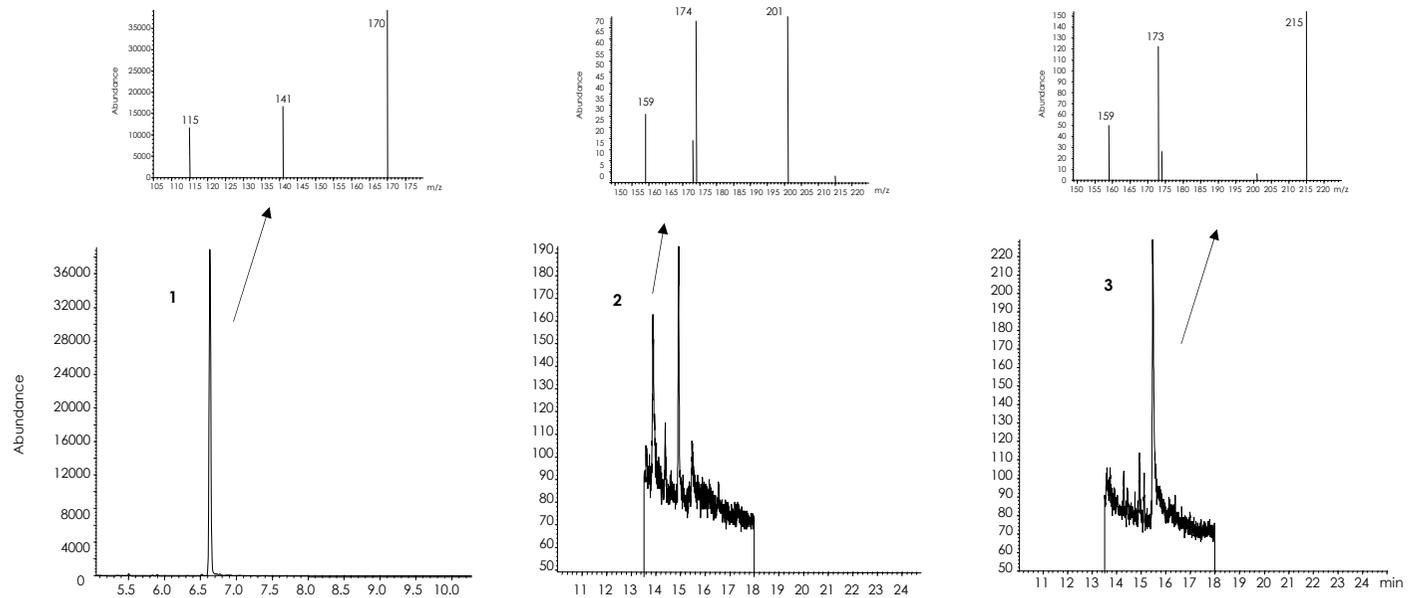


Figura 2.43. Cromatogramas GC-MS (extract ion) para una muestra real de naranja (número 13), detectándose la presencia de 1) OPP ($0.42 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$), 2) TBZ ($<0.5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$) y 3) imazalil ($<1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$)

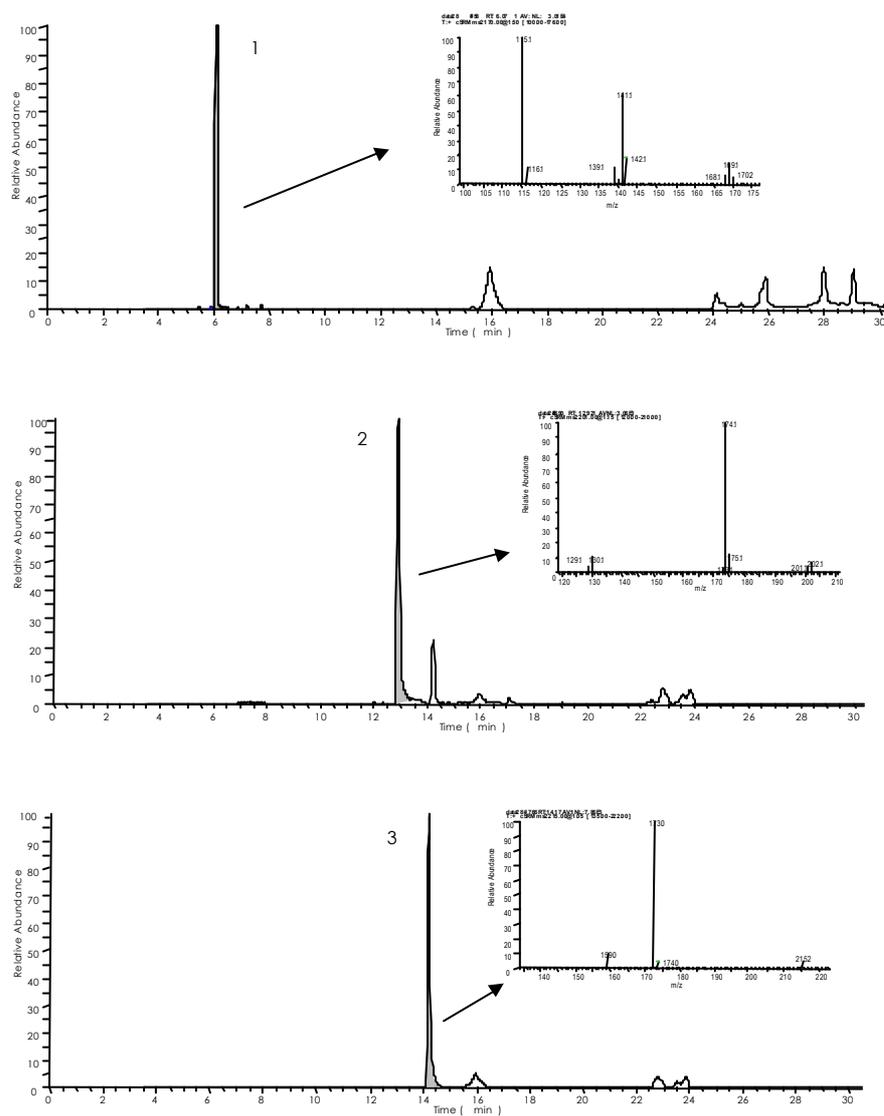


Figura 2.48. Cromatogramas GC-MS/MS correspondientes a la muestra naranja 13, detectándose presencia de 1) OPP ($0.4 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$), 2)TBZ ($0.6 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$) y 3) imazalil ($2.3 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$)

2.4. INTRODUCCIÓN

- [1] Antón, A., Lizaso, J., *Plaguicidas*, Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria (FUNDISA), disponible en <http://www.fundisa.org/articulos/fplaguicidas.pdf>, consultada 9 de febrero de 2004.
- [2] *Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuff*, (1996), General Inspectorate for Health Protection from Ministry of PublicHealth Welfare and Sport, Ed. P. van Zoonen, The Netherlands, Part 1, pp 1-22
- [3] Tharsis, N., Portillo, J.L., Broto-Puig, F., Comellas, L. (1997), *Simplified reversed-phase conditions for the determination of benzimidazole fungicides in fruits by high-performance liquid chromatography with UV detection*, J. Chromatogr. A, 78, 95-101.
- [4] Hiemstra, M., Joosten, J., de Kok, A. (1995), *Fully automated solid-phase extraction cleanup and on-line liquid chromatographic determination of benzimidazole fungicides in fruits and vegetables*, J. AOAC Int., 78 (5), 1267-1274.
- [5] Roberts, T.R., Hutson, D.H., Eds. (1999), *Metabolic Pathways of Agrochemicals*, Part 2, The Royal Society Chemistry, United Kingdom.
- [6] Ripley, B.D., Ritcey, G.M., Harris, C.R., Denommé, M.A., Lissemore, L.I. (2003), *Comparative persistence of pesticides on selected cultivars of specialty vegetables*, J. Agric. Food Chem., 51, 1328-1335.
- [7] Niessner, G., Buchberger, W., Eckerstorfer, R. (1999), *Multiresidue screening methods for the determination of pesticides in plant materials*, J. Chromatogr. A, 846, 341-348.
- [8] Hengel, M.J., Shibamoto, T. (2000), *Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Method for the analysis of dimethomorph fungicide in dried hops*, J. Agric. Food Chem., 48, 5824-5828.
- [9] López-López, T., Gil-García, M.D., Martínez-Vidal, J.L., Martínez-Galera, M. (2001), *Determination of pyrethroids in vegetables by HPLC using continuous*

on-line post elution photoirradiation with fluorescence detection, Anal. Chim. Acta, 447, 101-111.

- [10] Doong, RA., Lee CY, Sun YC. (1999), *Dietary intake and residues of organochlorine pesticides in foods from Hsinchu, Taiwan*, J. AOAC Int., 82(3), 677-682.
- [11] Pang, GF., Cao, YZ., Fan, CL., Zhang, JJ., Li, XM. (1998), *Multiresidue gas chromatographic method for determining synthetic pyrethroid pesticides in agricultural products; collaborative study*, J. AOAC Int., 82(1), 186-212.
- [12] Ramesh, A., Balasubramanian, M. (1999), *The impact of household preparations on the residues of pesticides in selected agricultural food commodities available in India*, J. AOAC Int., 82(3), 725-737.
- [13] Yamazaki, Y., Ninomiya, T. (1996), *Determination of Imazalil Residues in Lemons by Gas Chromatography with Nitrogen-Phosphorus Detection*, J. AOAC Int., 79(3), 787-790.
- [14] Mateos, R., Espartero, J.L., Trujillo, M., Rios, J.J., León-Camacho, M., Alcudia, F., Cert, A. (2001), *Determination of Phenols, Flavones and Lignans in Virgin Olive Oil by Solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection*, J. Agric. Food Chem., 49, 2185-2192.
- [15] Anastassiades, M., Schwack, W. (1998), *Analysis of carbendazim, benomyl, thiophanate methyl and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in fruits and vegetables after supercritical fluid extraction*, J. Chromatogr. A, 825, 45-54.
- [16] Singh, R.P., Chiba, M. (1993), *Determination of benomyl and its degradation products by chromatographic methods in water, wettable powder formulations, and crops*, J. Chromatogr., 643, 249-260.
- [17] Di Muccio, A., Camoni, I., Ventriglia, M., Attard Bandini, D., Mauro, M, Pelosi, P., Generali, T., Ausili, A, Girolimetti, S. (1995), *Simplified clean-up for the determination of benzimidazolic fungicides by high-performance liquid chromatography with UV detection*, J. Chromatogr. A, 697, 145-152.
- [18] Lacassie, E., Dreyfuss, M.F., Daguet, J.L., Vignaud, M., Marquet, P., Lachâtre, G. (1999), *Liquid chromatography-electrospray multiresidue*

- determination of pesticides in apples and pears*, J. Chromatogr. A, 830, 135-143.
- [19] Bernal, J.L., del Nozal, M.J., Toribio, L., Jiménez, J.J., Atienza, J. (1997), *High-performance liquid chromatographic determination of benomyl and carbendazim residues in apian samples*, J. Chromatogr. A, 787, 129-136.
- [20] Fernández, M. (2001), *Tesis Doctoral: Evaluación de la toxicidad de plaguicidas en productos hortofrutícolas por técnicas cromatográficas*, Universidad de Valencia.
- [21] Pous, X., Ruíz, M.J., Picó, Y., Font, G. (2001), *Determination of imidacloprid, metalaxyl, micobutanil, protham, and thiabendazole in fruits and vegetables by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry*, Fresenius J. Anal. Chem., 371, 182-189.
- [22] Levine, R.A., Luchtefeld, R.G., Hopper, M.L., Salmon, G.D. (1998), *Automated Method for Cleanup and Determination of Benomyl and Thiabendazole in Table-Ready Foods*, J. AOAC Int., 81 (6), 1217-1223.
- [23] Yamazaki, Y., Ninomiya, T. (1999), *Determination of benomyl, diphenyl, o-phenylphenol, thiabendazole, chlorpyrifos, methidathion, and methyl parathion in oranges by solid-phase extraction, liquid chromatography, and gas chromatography*, J. AOAC Int., 82(6), 1474-1478.
- [24] Corta, E. (2000), *Tesis Doctoral: Estudio de la determinación de residuos de acaricidas en muestras avícolas*, Universidad del País Vasco.
- [25] Yamazaki, Y., Ninomiya, T. (1998), *Determination of bitertanol residues in strawberries by liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by gas chromatography / mass spectrometry*, J. AOAC Int., 82(6), 1252-1256.
- [26] Hernando, M.D. (2000), *Tesis Doctoral: Métodos cromatográficos acoplados a espectrometría de masas y bioensayos de toxicidad aguda*, Universidad de Almería.
- [27] Martínez Vidal, J.L., Arrebola, F.J., Mateu-Sánchez, M. (2002), *Application to routine analysis of a method to determine multiclass pesticide residue in fresh vegetables by gas chromatography/tandem mass spectrometry*, Rapid Commun. Mass Spectrom., 16, 1106-1115.

- [28] Martínez Vidal, J.L., Arrebola, F.J., Mateu-Sánchez, M. (2002), *Application of gas chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of pesticides in fruits and vegetables*, J. Chromatogr. A, 959, 203-213.
- [29] Gamón, M., Lleò, C., Ten, A. (2001), *Multiresidue determination of pesticides in fruit and vegetables by gas chromatography/tandem mass spectrometry*, J. AOAC Int., 84 (4), 1209-1216.
- [30] *CarboFrit inlet liner inserts*, (1996), Restek Corporation, disponible en <http://www.chromtech.net.au/pdf/Adv-CarboFrit.pdf>, consultada 26 de junio de 2003.
- [31] Santos, F.J., Galceran, M.T. (2003), *Modern developments in gas chromatography-mass spectrometry-based environmental analysis*, J. Chromatogr. A, 1000, 125-151.
- [32] *Residues: Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre-registration data requirements for Annex II and Annex III of Directive 91/414*, (2002), European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection, Commission working document SANCO/3029/99.

3

DETERMINACIÓN DE FUNGICIDAS
MEDIANTE ACOPLAMIENTO LC-LC

3.1. INTRODUCCIÓN

A la vista de los resultados obtenidos para el o-fenilfenol en el método optimizado para la determinación de fungicidas mediante LC-DAD/FD (capítulo 2.1) se plantea desarrollar un nuevo método para este analito, basado en el acoplamiento de dos columnas cromatográficas (LC-LC), con el objeto de mejorar las recuperaciones de este compuesto.

El acoplamiento LC-LC se caracteriza por permitir integrar la preparación y purificación de la muestra en el procedimiento cromatográfico de manera automatizada, mediante el acoplamiento de dos columnas analíticas. De este modo, es posible eliminar las etapas de purificación *off-line*, durante las cuales se puede producir pérdida de analitos, tal y como ocurrió en el caso de o-fenilfenol durante la purificación de extractos vegetales en cartuchos de fase diol en el método antes mencionado.

3.1.1. Acoplamiento LC-LC

En el acoplamiento LC-LC, también denominado *column-switching*, la muestra es introducida en una columna analítica (C-1) donde se lleva a cabo la primera separación cromatográfica, en la cual los analitos se separan de los principales interferentes. Posteriormente, la fracción que contiene los analitos se transfiere de modo selectivo, a través de una interfase adecuada, hasta la segunda columna (C-2), en la que se realiza la separación final de los mismos (Figura 3.1).

El acoplamiento entre columnas cromatográficas más interesante es aquel que permite una mayor selectividad, lo cual se consigue con mayor éxito cuando se acoplan dos columnas con mecanismos de separación diferentes; esto es lo que se conoce como acoplamiento ortogonal y da origen a una verdadera cromatografía líquida multidimensional. Sin embargo, también se pueden llevar a cabo acoplamientos eficaces utilizando dos columnas semejantes.

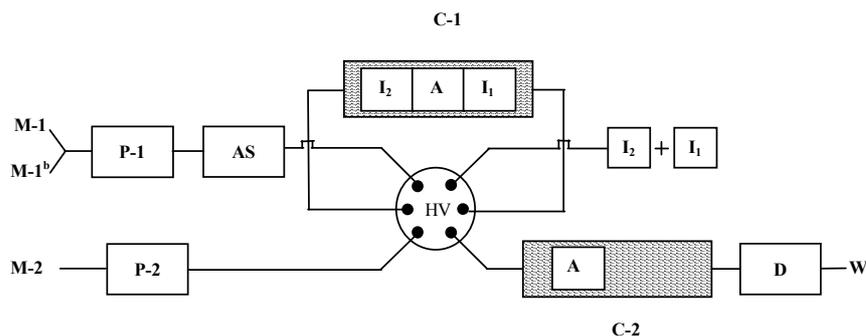


Figura 3.1. Representación esquemática de un acoplamiento LC-LC.

C-1 y C-2, primera y segunda columna separadora; AS, autoinyector; I₁ e I₂, interferentes de la muestra; A, fracción de analito; M-1, fase móvil para la purificación en C-1; M-1^b, fase móvil para la eliminación de los interferentes más retenidos en C-1; M-2, fase móvil de C-2; P-1 y P-2, bombas de LC; HV, válvula de alta presión; D, detector; W, desecho.

Etapas de Análisis

En todo método analítico basado en el acoplamiento LC-LC se deben considerar las siguientes etapas básicas:

- *Inyección.* En esta etapa la muestra se carga en el loop del inyector, mientras la fase móvil M-1 circula por la columna C-1 y la fase móvil M-2 por la columna C-2. A continuación, se activa la válvula del inyector y comienza el análisis pasando a la etapa de purificación (Figura 3.2.A).
- *Purificación.* Esta etapa se denomina así porque en la columna C-1 la fase móvil M-1 eluye los interferentes menos retenidos (I₁) que van al desecho. Cuando el primer analito empieza a eluir de la columna C-1, se activa la válvula de seis vías, que actúa como interfase, y se empiezan a transferir los analitos a la columna C-2 (Figura 3.2.B).
- *Transferencia.* En esta etapa las columnas C-1 y C-2 están acopladas en línea, mientras la fase móvil M-2 pasa por la columna C-1 y va transfiriendo los analitos hasta la columna C-2, por donde sigue pasando la fase móvil M-2. Cuando el último analito ha sido transferido a la columna C-2, se activa de nuevo la válvula de seis vías y se finaliza la etapa de transferencia (Figura 3.2.C).

- *Análisis y lavado.* Durante esta etapa la fase móvil M-2 va separando los analitos mediante cromatografía convencional en la columna C-2. Al mismo tiempo, por la primera columna C-1 vuelve a pasar la fase móvil M-1 u otra fase móvil M-1^b con mayor fuerza elutrópica, con el objetivo de que terminen de eluir los interferentes que no han sido eliminados todavía. Seguidamente, se acondiciona la columna C-1 con la fase M-1 para la siguiente inyección (Figura 3.2.D).

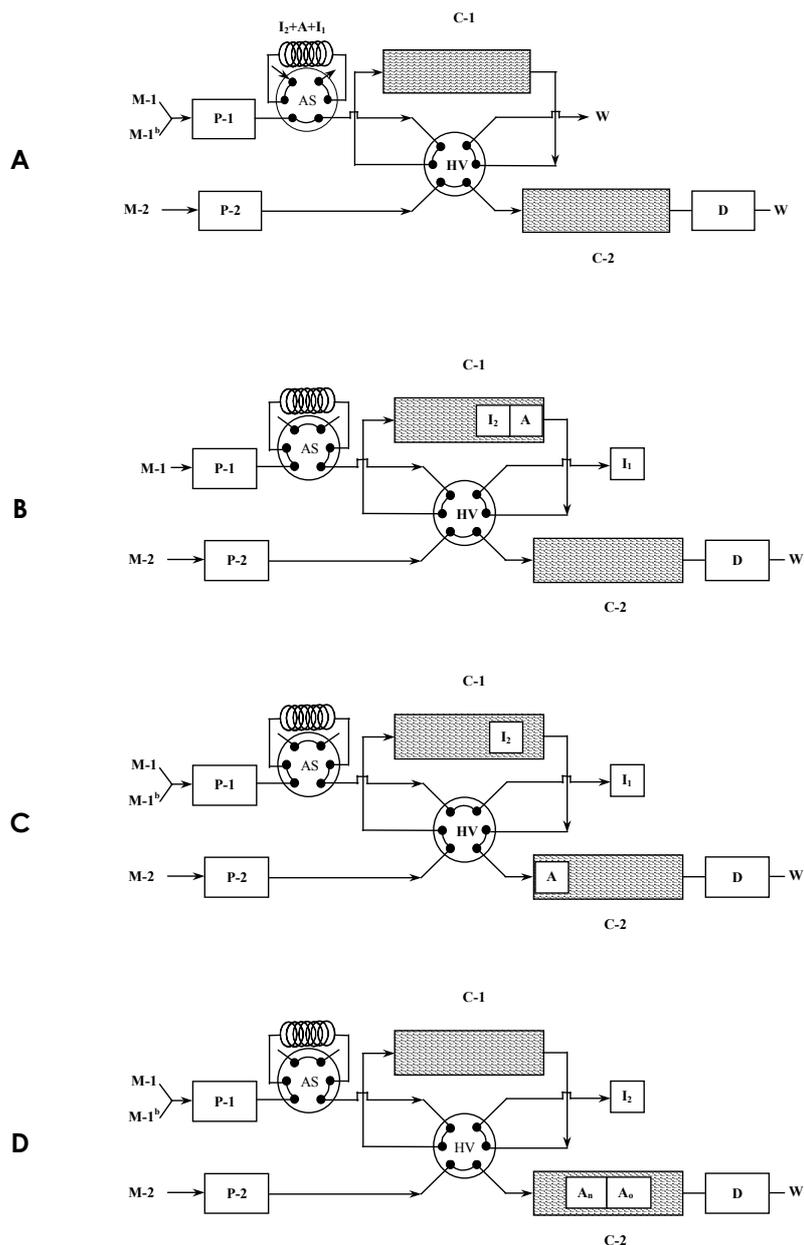


Figura 3.2. Etapas de un procedimiento basado en el acoplamiento LC-LC.

(A) Inyección (B) Purificación (C) Transferencia (D) Análisis

C-1 y C-2, primera y segunda columna separadoras; AS, autoinyector o inyector manual; A, fracción de analito; A_n , A_o , analitos de la muestra; I_1 e I_2 , interferentes; P-1 y P-2, bombas de LC; M-1, fase móvil para la purificación en C-1; M-1^b, fase móvil eluyente fuerte; M-2, fase móvil de C-2; HV, válvula de alta presión de 6 vías; D, detector; W, desecho.

Selección de Condiciones

Entre los parámetros de acoplamiento que se deben optimizar de acuerdo con Hogendoorn *et al.* (1991) [17], se encuentran los siguientes.

- *Selección de la primera columna (C-1).* En el caso del ARP se suelen usar columnas C₁₈ de 15-30 mm de longitud y de diámetro interno 3.2-4.6 mm.
- *Fuerza elutrópica de la fase móvil (M-1).* La elección de este parámetro determina en gran medida la eficacia y la selectividad de la técnica utilizada. Una fuerza elutrópica baja permite la inyección de volúmenes mayores de muestra, pero disminuye la separación eficaz de los analitos y los interferentes. Mientras que una fuerza elutrópica elevada mejora la resolución entre interferentes y analitos, aunque supone disminuir la etapa de purificación.

Después de la selección de la columna C-1 y de la composición de la fase móvil M-1, se deben determinar las condiciones de acoplamiento de las columnas. Para ello, se realizan dos experiencias:

- *Optimización del volumen de purificación.* La determinación de este parámetro se lleva a cabo fácilmente, conectando directamente la columna C-1 al sistema de detección utilizado, e inyectando el analito menos retenido usando la fase móvil M-1. El tiempo transcurrido desde que se activa la válvula de inyección hasta que empieza a eluir el analito menos retenido de C-1 es el tiempo de purificación y el volumen de fase móvil requerido corresponde al volumen de purificación. En el momento en que el analito menos retenido empieza a eluir de C-1 se debe iniciar la transferencia selectiva de los analitos a C-2 usando la fase móvil M-2.
- *Optimización del volumen de transferencia.* Se determina conectando, de nuevo, C-1 al detector e inyectando el analito más retenido. El volumen de transferencia viene dado por el volumen de fase móvil M-2 necesario para que eluya el analito más retenido de C-1. El tiempo transcurrido desde que termina la purificación hasta que eluye el analito más retenido es el tiempo de transferencia. Es importante que la fracción de muestra transferida durante este periodo de tiempo sea lo más pequeña posible para minimizar el ensanchamiento de bandas y para que la transferencia

sea lo más selectiva posible y se pueda eliminar el mayor número posible de especies interferentes.

Tanto el volumen de purificación como el de transferencia deben comprobarse periódicamente con la finalidad de comprobar si se mantienen las condiciones de acoplamiento y evitar, de este modo, pérdidas del analito menos retenido, al mismo tiempo que se comprueba que se lleva a cabo la transferencia completa del analito más retenido.

Aplicaciones del Acoplamiento LC-LC en el Análisis de Residuos de Plaguicidas

El acoplamiento LC-LC es una técnica muy adecuada para la determinación selectiva de un número limitado de analitos presentes en matrices más o menos complejas. El aislamiento de la fracción adecuada en la primera columna y su transferencia a la segunda proporcionan la selectividad requerida en el análisis de trazas.

Se han descrito diversas aplicaciones para el análisis de plaguicidas de polaridades medias o altas en diferentes matrices tales como aguas, suelos, vegetales, etc. Las primeras aplicaciones de la técnica de columnas acopladas en el campo del ARP hacían uso de pequeñas columnas como C-1, con el objeto de preconcentrar muestras acuosas evitando las extracciones manuales [1-2]. Posteriormente, se planteó el uso de columnas más largas con la finalidad de aumentar su poder de separación y, de esta manera, conseguir una purificación más eficaz de la muestra [3].

Más recientemente, en nuestro laboratorio se han determinado mediante esta técnica compuestos especialmente difíciles desde el punto de vista analítico, como es el caso de los herbicidas glufosinato y glifosato, y el principal producto de transformación de éste último, el ácido aminometilfosfónico (AMPA), en diferentes matrices complejas [4-7].

Así mismo, se ha descrito la determinación en aguas de otros herbicidas polares, tales como el bromacilo y diuron [8], así como herbicidas triazínicos (simazina, atrazina, terbutilazina y terbutrin) y sus productos de transformación (deisopropilatrazina, deetilatrastina e hidroxiatrazina) [9-11], mediante la inyección directa de 2 mL de muestra en el sistema LC-LC

utilizando dos columnas de tipo C₁₈. De este modo se obtuvieron límites de detección comprendidos entre 0.1 y 1 µg·L⁻¹.

Entre los trabajos desarrollados por nuestro grupo de investigación se encuentra también la aplicación del acoplamiento LC-LC para la determinación de MCPA y sus principales metabolitos (2-metil-clorofenol y 4-clorofenol) en diversas matrices medioambientales. Así, se acoplaron columnas C₁₈ - C₁₈, en el caso de muestras acuosas, y columnas C₁₈ - RAM (*Restricted Access Media*), para muestras de suelos y vegetales. De esta manera, se obtuvieron límites de detección de entre 0.1 y 0.5 µg·L⁻¹ en aguas y de entre 0.02 y 0.05 mg·Kg⁻¹ en el caso de suelos y vegetales [12].

La utilización del acoplamiento LC-LC no es muy compatible con el desarrollo de métodos de análisis multiresiduales, pues podrían requerirse volúmenes de transferencia elevados y se perderían, en gran parte, las ventajas de mejora de selectividad de la técnica [13, 16]. A pesar de ello, Hogendoorn y van Zoonen [15] describieron la determinación de 9 plaguicidas (benazolin, bentazon, bromoxinil, cloridazona, desmedifam, ioxinil, metoxuron, metabenzotiaxuron) en cereales. En este caso se prescindió de parte de la selectividad de la técnica al trabajar con volúmenes de transferencia muy elevados que, sin embargo, permitieron eliminar los interferentes poco retenidos [16]. Posteriormente, se ha descrito la determinación multiresidual de 8 herbicidas clorofenoxiácidos mediante LC-LC llevando a cabo, en este caso, la transferencia de todos los analitos con sólo 0.5 mL de fase móvil M-2 desde una primera columna de tipo RAM hasta una columna C₁₈ convencional [17].

Los progresos actuales en los modernos sistemas de detección, tales como la espectrometría de masas (MS) junto con el desarrollo de nuevas columnas cromatográficas, no han supuesto también una pérdida de interés por esta técnica, como tal vez podría pensarse, ya que el uso de LC-LC en el campo del análisis de microcontaminantes orgánicos y, más concretamente, de residuos de plaguicidas sigue presentando ventajas importantes [13].

Así, recientemente se ha desarrollado un método para la determinación multiresidual de herbicidas ácidos (metil-sulfometuron, bentazona, bromoxinil, ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético y ácido 2-metil-4-clorofenoxiopropiónico) en muestras de agua, mediante inyección directa de la muestra en el sistema LC-LC

y detección por MS, obteniéndose límites de detección del orden de $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Adicionalmente, se ha comprobado que el acoplamiento de columnas Discovery C_{18} - ABZ⁺ ha sido la opción más favorable para la eliminación del efecto matriz en este tipo de muestras [14].

Con respecto a la determinación de fungicidas mediante técnicas cromatográficas acopladas (LC-LC), pocas son las aplicaciones realizadas de acuerdo con la bibliografía actual. Se ha determinado con éxito la etilentiourea (ETU) en aguas, metabolito polar formado por degradación de fungicidas etilbisditiocarbamatos [18], obteniéndose directamente un límite de detección de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, sin efectuar ningún tipo de preconcentración y utilizando dos columnas acopladas de tipo C_{18} . También se ha llevado a cabo la determinación de los enantiómeros del fungicida epoxiconazol mediante el acoplamiento de columnas (PC-LC) [19], para lo cual se ha hecho uso de una primera columna preconcentradora C_{18} y de una segunda columna rellena con fase quiral *MCTA* (*microcrystalline cellulose triacetate*) que ha permitido la separación de los compuestos enantioméricos, con un límite de detección de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en muestras de agua y $0.2 \text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ en muestras de suelo.

Cabe resaltar que el acoplamiento LC-LC ha sido poco utilizado en el campo del ARP, a pesar de las valiosas ventajas que esta técnica aporta y que se ponen de manifiesto en los estudios realizados hasta el momento. Posiblemente, las mayores dificultades de manejo, el desconocimiento de la técnica, la necesidad de tener que controlar un mayor número de variables, así como la mayor complejidad instrumental en comparación con la LC convencional, sean la causa de las escasas aplicaciones de esta modalidad de acoplamiento [20].

En cuanto a las ventajas del acoplamiento LC-LC, cabe destacar como las más importantes la mejora de selectividad, el aumento de sensibilidad al posibilitar la inyección de grandes volúmenes de muestra (hasta 5 mL), y su fácil automatización. Se trata de una técnica muy útil para la determinación de compuestos especialmente difíciles desde el punto de vista analítico, cuyo aislamiento, extracción, purificación o preconcentración de la muestra puedan resultar problemáticos. Por otro lado, el acoplamiento LC-LC permite una reducción del tiempo de análisis, ya que el tratamiento previo de las muestras, es generalmente, más corto, y la purificación se lleva a cabo de forma automatizada en el propio sistema LC-LC. Además, mientras en la columna

analítica (C-2) se realiza la separación de los analitos con la fase móvil M-2, la primera columna se está lavando simultáneamente con M-1 y acondicionando para la siguiente inyección. Otra característica que tiene el acoplamiento LC-LC es la protección de la columna (C-2), ya que la columna C-1 actúa selectivamente entre los analitos e interferentes de la matriz. Como consecuencia de ello, la columna C-1 recibe toda la carga de la muestra y debe renovarse periódicamente.

Recientemente, Hernández y Hogendoorn han revisado los aspectos más relevantes, el potencial y la versatilidad de esta técnica para la determinación de compuestos orgánicos en distintos campos de aplicación [21-22].

3.1.2. Referencias

- [1] Goewie, C.E., Brinkman, U.A.Th., Frei, R.W. (1981), *Trace enrichment of polar compounds on chemically bonded and carbonaceous sorbents and application to chlorophenols*, Anal. Chem., 53, 2072
- [2] Goewie, C.E., Kwakman, P., Frei, R.W., Brinkman, U.A.Th., Maasfeld, W., Seshadri, T., Kettrup, A. (1984), *Pre-column technology in high-performance liquid chromatography for the determination of phenylurea herbicides in water in the presence of their anilines*, J. Chromatogr. A., 284, 73.
- [3] Hogendoorn, E., Goewie, C.E. (1988), *Analytical methods for residues of pesticides in foodstuffs*, 51 edición, Greve, P.A. editor, SDU Publishers, La Haya, Países Bajos, parte II, p. 158.
- [4] Sancho, J.V., López, F.J., Hernández, F., Hogendoorn, E.A., van Zoonen, P. (1994), *Rapid determination of glufosinate in environmental water samples using 9-fluorenylmethoxycarbonyl precolumn derivatization, large-volume injection and coupled-column liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 678, 59
- [5] Sancho, J.V., Hernández, F., López, F.J., Hogendoorn, E.A., Dijkman, E., van Zoonen, P. (1996), *Rapid determination of glufosinate, glyphosate and aminomethylphosphonic acid labeling and coupled-column liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 737, 75.

- [6] Sancho, J.V., Hidalgo, C., Hernández, F., López, F.J., Hogendoorn, E.A., Dijkman, E. (1996), *Rapid determination of glyphosate residues and its main metabolite AMPA in soil samples by liquid chromatography*, Intern. J. Environ. Anal. Chem., 62, 53.
- [7] Hernández, F., Hidalgo, C., Sancho, J.V. (2000), *Determination of glyphosate residues in plants by precolumn derivatization and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection*, J. AOAC Int., 83 (3), 728.
- [8] Sancho, J.V., Hidalgo, C., Hernández, F. (1997), *Direct determination of bromacil and diuron residues in environmental water samples by coupled-column liquid chromatography and large-volume injection*, J. Chromatogr. A, 761, 322.
- [9] Hidalgo, C., Sancho, J.V., Hernández, F. (1997), *Trace determination of triazine herbicides by means of coupled-column liquid chromatography and large volume injection*, Anal. Chim. Acta, 338, 223.
- [10] Hernández, F., Hidalgo, C., Sancho, J.V., López, F.J. (1997), *New method for the rapid determination of triazine herbicides and some of their main metabolites in water by using coupled-column liquid chromatography and large volume injection*, J. Chromatogr. A, 778, 171.
- [11] Hernández, F., Beltrán, J., López, F.J., Gaspar, J.V. (2000), *Use of solid phase microextraction for the quantitative determination of herbicides in soil and water samples*, Anal. Chem., 72, 2313-2322.
- [12] Hernández, F., Hidalgo, C., Grimalt, S., Sancho, J.V. (2001), *Application of column-switching liquid chromatography to the determination of polar herbicide in different environmental matrices. MCPA as a case study*, Quím. Anal., 20, 81.
- [13] Hogendoorn, E., van Zoonen, P. (2000), *Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis*, J. Chromatogr. A, 892, 435.
- [14] Dijkman, E., Mooibroek, D., Hoogerbrugge, R., Hogendoorn, E., Sancho, J.V., Pozo, O., Hernández, F. (2001), *Study of matrix effects on the direct trace analysis of acidic pesticides in water using various liquid*

- chromatographic modes coupled to tandem mass spectrometric detection*, J. Chromatogr. A, 926, 113.
- [15] Hogendoorn, E.A., van Zoonen, P. (1990), *Development of multi-method for residue analysis of 9 polar pesticides in cereals using RPLC column-switching*, Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 55, 1275
- [16] Hogendoorn, E.A., van Zoonen, P. (1995), *Coupled-column reversed-phase liquid chromatography in environmental analysis*, J. Chromatogr. A, 703, 149.
- [17] Sancho, J.V., Hernández, F., Hogendoorn, E., van Zoonen, O. (1993), *Rapid method for the determination of eight chlorophenoxy acid residues in environmental water samples using off-line solid-phase extraction and on-line selective precolumn switching*, Anal. Chim. Acta., 283, 287.
- [18] Hogendoorn, E.A., van Zoonen, P., Brinkman, U.A.Th. (1991), *Column-switching RPLC for the trace-level determination of ethylenethiourea in aqueous samples*, Chromatographia, 31, 285.
- [19] Hutta, M., Rybár, I., Chalányová, M. (2002), *Liquid chromatographic method development for determination of fungicide epoxiconazole enantiomers by achiral and chiral column switching technique by water and soil*, J. Chromatogr. A, 959, 143.
- [20] Hidalgo, C. (1999), *Tesis Doctoral, Simplificación del tratamiento de muestra en el análisis de residuos de herbicidas en aguas mediante aplicación de las técnicas cromatográficas acopladas LC-LC y SPE-LC*, Universidad Jaume I.
- [21] Hogendoorn, E.A., van Zoonen, P., Hernández, F. (2003), LC-GC, Europe, 16, 44-51.
- [22] Hernández, F., Sancho, J.V., *Liquid Chromatography: Multidimensional*, Encyclopedia Anal. Sci., 2nd edition, Edited by Worsfold, P., Townshend, A. and Poole, C. (en prensa)

3.2. EXPERIMENTAL. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE FUNGICIDAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA CON COLUMNAS ACOPLADAS (LC-LC/FD)

Inicialmente, se planteó el desarrollo de un método para la determinación de o-fenilfenol en naranjas. Para ello se hizo uso del procedimiento de extracción optimizado durante el método LC. Así, se llevó a cabo la extracción del analito con acetona, diclorometano-éter de petróleo y acetato de etilo. El extracto obtenido se concentró, realizándose un cambio de disolvente con el objeto de obtener el medio más adecuado (acetonitrilo:agua, 50:50, v/v), para su inyección en el sistema LC-LC.

Posteriormente, se amplió el alcance del método para su aplicación en bananas con el objeto de efectuar la determinación simultánea de bitertanol y o-fenilfenol, aprovechando que ambos fungicidas poseían características cromatográficas similares que facilitaban su determinación conjunta. Esta consideración se realizó además, considerando que el uso de bitertanol en las plantaciones de banano reviste tanta importancia como el uso de o-fenilfenol en el tratamiento post-cosecha de naranjas, siendo las dos matrices vegetales objeto de estudio en esta tesis.

3.2.1. Optimización de Condiciones Cromatográficas

Selección de la Longitud de Onda

La detección por fluorescencia en el acoplamiento LC-LC resulta adecuada para o-fenilfenol y bitertanol, atendiendo a la alta sensibilidad que presenta este sistema de detección para estos fungicidas.

Las longitudes de onda de excitación y de emisión para o-fenilfenol y bitertanol fueron las seleccionadas para el método anteriormente desarrollado por LC, las cuales se detallan en el capítulo correspondiente.

Estudio de la Separación Cromatográfica en el Acoplamiento LC-LC

El sistema de columnas acopladas utilizado consistió en una primera columna C-1 de pequeñas dimensiones (30 x 4 mm d.i.), rellena con fase reversa C₁₈ y en una segunda columna C-2 de mayor longitud (120 x 4 mm d.i.) con la misma fase, de modo que aunque no se recurrió a separaciones ortogonales se aprovechó el poder de separación de ambas columnas y la mayor eficiencia de la técnica LC-LC.

El grado de selectividad y sensibilidad que se puede alcanzar con un acoplamiento LC-LC depende del volumen de muestra que se puede inyectar en la primera columna y transferir a la segunda sin producir un ensanchamiento de bandas excesivo de los analitos. En este sentido, la inyección en el sistema LC-LC de 100 µL de extracto vegetal fue suficiente para alcanzar la sensibilidad y selectividad necesarias que permitiesen la determinación de los fungicidas seleccionados.

La optimización de la separación cromatográfica supuso el estudio de la composición de las fases móviles con el objeto de obtener una buena resolución en C-2 usando M-2, así como el estudio de la compatibilidad entre la usada para la purificación, M-1, y para la transferencia y separación analítica final, M-2.

En este sentido, se conocía el comportamiento del o-fenilfenol y del bitertanol en la columna C-2 a partir de las experiencias realizadas para la optimización del método LC con el mismo tipo de columna C₁₈. Así pues, la fase móvil seleccionada dependió de la matriz y del número de analitos estudiados, de modo que para la determinación únicamente de o-fenilfenol en naranjas se utilizó como M-2 una disolución isocrática de acetato de amonio 0.01 M y acetonitrilo (45:55, v/v), mientras que para la determinación simultánea de o-fenilfenol y bitertanol en bananas se usó como fase móvil M-2, la misma mezcla de disolventes en una proporción diferente (40:60, v/v).

En segundo lugar, se estudió la fase móvil M-1 apropiada para la purificación en la primera columna C-1. Para la determinación de o-fenilfenol en naranjas, la fase móvil M-1 consistió en una disolución isocrática de acetato de amonio 0.01 M y acetonitrilo (70:30, v/v), mientras que para la determinación

de o-fenilfenol bitertanol en bananas se hizo uso de un gradiente de elución utilizando los mismos disolventes, el cual se describe en el artículo científico que se incluye al final del presente capítulo.

Después de la selección de M-2 y M-1, se estudiaron los tiempos/volumenes de purificación y de transferencia óptimos para el acoplamiento. En la Figura 3.3. se muestra el cromatograma correspondiente a un patrón de $400 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de o-fenilfenol, obtenido conectando C-1 directamente al detector FD. En este cromatograma se pueden observar los tiempos de purificación y transferencia del o-fenilfenol, seleccionados para el estudio en naranjas. En el caso de las bananas, una figura similar se presenta en el artículo científico incluido, para la transferencia conjunta de o-fenilfenol y bitertanol.

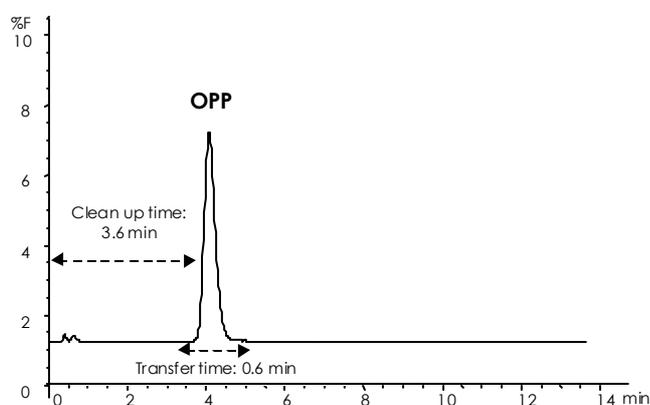


Figura 3.3. Cromatograma LC correspondiente a una disolución patrón de $400 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de OPP, obtenido con C-1 conectada al detector FD (excitación: 257 nm , emisión: 343 nm). Volumen inyectado, $100 \mu\text{L}$; C-1, columna C_{18} ($30 \times 4 \text{ mm d.i.}$); M-1 para clean-up, acetato de amonio 0.01M / acetonitrilo ($70:30, v/v$); M-2 para transferencia, acetato de amonio 0.01M / acetonitrilo ($45:55, v/v$); flujo, $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

En la Tabla 3.1 se resumen las condiciones de acoplamiento y análisis finalmente seleccionadas.

Tabla 3.1. Condiciones seleccionadas de acoplamiento y análisis LC-LC.

Matriz	Analito	Purificación	Transferencia	Análisis
Banana	OPP: ($\lambda_{\text{ex}}=257$, $\lambda_{\text{em}}=343$)	C-1: Kromasil C ₁₈ (120 x 4 mm d.i., 5 μ m)	C-1: Kromasil C ₁₈ (120 x 4 mm d.i., 5 μ m)	C-2: Kromasil C ₁₈ (30 x 4 mm d.i., 5 μ m)
	Bitertanol: ($\lambda_{\text{ex}}=224$, $\lambda_{\text{em}}=329$)	tiempo purif: 3.2 min M-1: Gradiente de CH ₃ COONH ₄ 0.01M/ACN (0-2.50 min, 60:40; 2.51-10 min, 40:60; 10.01-12 min, 60:40).	tiempo transf: 2.2 min M-2: CH ₃ COONH ₄ 0.01M/ACN (40:60)	M-2: CH ₃ COONH ₄ 0.01M/ACN (40:60)
Naranja	OPP: ($\lambda_{\text{ex}}=257$, $\lambda_{\text{em}}=343$)	C-1: Kromasil C ₁₈ (120 x 4 mm d.i., 5 μ m)	C-1: Kromasil C ₁₈ (120 x 4 mm d.i., 5 μ m)	C-2: Kromasil C ₁₈ (30 x 4 mm d.i., 5 μ m)
		tiempo purif: 3.6 min M-1: CH ₃ COONH ₄ 0.01M/ACN (70:30)	tiempo transf: 0.6 min M-2: CH ₃ COONH ₄ 0.01M/ACN (45:55)	M-2: CH ₃ COONH ₄ 0.01M/ACN (45:55)

3.2.2. Características Analíticas

Una vez optimizadas las condiciones cromatográficas, se estudiaron las características analíticas, en cuanto a linealidad y precisión, utilizando disoluciones patrón de los fungicidas seleccionados.

La validación del método se llevó a cabo mediante el estudio de la exactitud y precisión, a partir de ensayos de recuperación en muestras fortificadas a dos niveles de concentración en naranjas (0.05 y 4 mg·Kg⁻¹) y a tres niveles de concentración en bananas (0.01, 0.05 y 1.2 mg·Kg⁻¹). La cuantificación de los resultados se realizó mediante calibración con patrón externo, obteniéndose recuperaciones satisfactorias, comprendidas entre el 70 y 115%.

Los niveles de fortificación más bajos que se ensayaron, fueron propuestos como límites de cuantificación (LOQ), esto es 0.05 mg·Kg⁻¹ para o-fenilfenol en naranjas y 0.01 mg·Kg⁻¹ para o-fenilfenol y bitertanol en bananas. A partir de los cromatogramas correspondientes al nivel LOQ, se estimaron los límites de detección (LOD) del método, resultando ser inferiores a 0.01 mg·Kg⁻¹ para ambos analitos en naranjas y bananas.

Finalmente, el método validado fue aplicado a muestras reales de naranja y banana. Al respecto, los resultados de las experiencias de optimización, validación y aplicación del método LC-LC a muestras vegetales se encuentran recogidos en el artículo científico que se adjunta al final del presente capítulo. Sin embargo, cabe comentar con más detalle, a continuación, algunos datos obtenidos durante el estudio de las características analíticas del método, que no han sido incluidos en el mencionado artículo.

Linealidad

El estudio de la linealidad se llevó a cabo mediante la inyección de 100 μL de disoluciones patrón acuosas en un rango de concentración comprendido entre 4-1000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

En la Figura 3.4. se muestran las curvas de calibrado para cada analito obtenidas a partir de las áreas de pico.

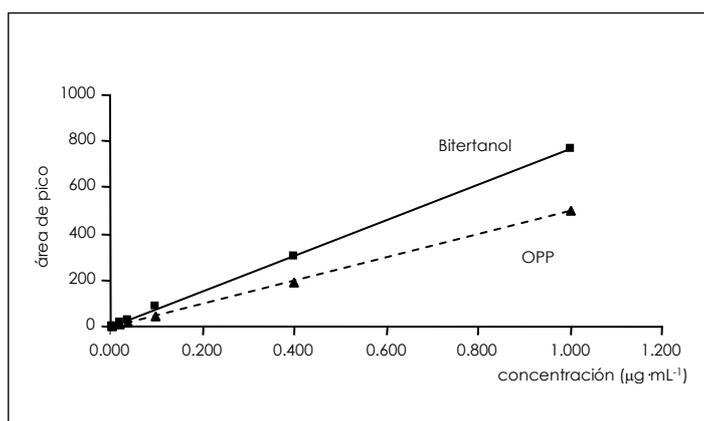


Figura 3.4. Curvas de calibrado correspondientes a OPP y bitertanol, obtenidas mediante LC-LC/FD.

Los datos de regresión obtenidos para las curvas de calibrado se recogen en la Tabla 3.2. En ella se puede observar que se cumple el comportamiento lineal de los fungicidas seleccionados en el rango de concentración ensayado.

Tabla 3.2. Estudio de la linealidad del método LC-LC/FD para la determinación de OPP y bitertanol.

	o-Fenilfenol	Bitertanol
<i>Ordenada de origen</i>	-4.338	0.475
<i>Error estándar de ordenada de origen</i>	2.345	2.385
<i>Pendiente</i>	0.501	0.765
<i>Error estándar de pendiente</i>	0.005	0.005
<i>Coefficiente de regresión (R)</i>	0.9998	0.9999
<i>Error global de la regresión lineal</i>	4.638	4.718
<i>Nivel de significación</i>	7.6 x 10 ⁻⁸	1.5 x 10 ⁻⁸

Precisión

Se evaluó la precisión intermedia mediante repetidas inyecciones (n=9) de una disolución patrón de o-fenilfenol y bitertanol a un nivel de concentración de 10 ng·mL⁻¹, en tres días distintos. Se obtuvieron coeficientes de variación, inferiores al 15% en la respuesta y menos del 5% en cuanto a tiempos de retención.

Límites de Detección

A la vista de la Figura 3.5, que corresponde a una disolución patrón del nivel de concentración más bajo inyectado (4 ng·mL⁻¹), se propone un límite de detección en patrón del orden de 1 ng·mL⁻¹, obtenido como tres veces la relación señal/ruido (S/N=3). Este valor de 1 ppb correspondería al límite de detección instrumental. Los valores de LOD y LOQ para el método LC-LC aplicado a muestras reales de banana y naranja se encuentran en el artículo científico mostrado al final de este capítulo.

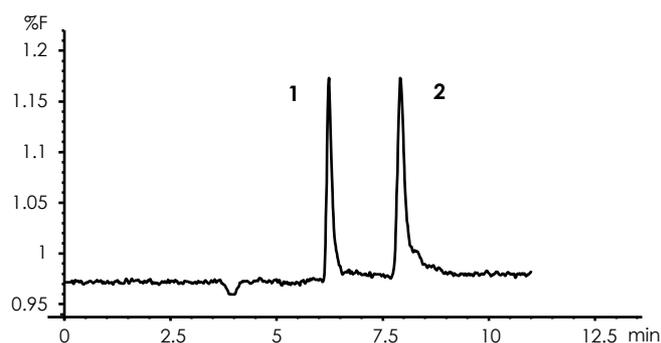


Figura 3.5. Cromatograma LC-LC/FD correspondiente a una disolución patrón de $4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de OPP y bitertanol. Volumen de inyección, $100 \mu\text{L}$; C1-C2, columnas C_{18} $30 \times 4 \text{ mm d.i.}$ y $120 \times 4 \text{ mm d-i,}$ respectivamente; M-1, gradiente acetato de amonio $0.01 \text{ M/acetoneitrilo}$ indicado en el trabajo experimental; M-2, acetato de amonio $0.01 \text{ M/acetoneitrilo}$ ($40:60, \text{ v/v}$); Tiempo de purificación, 3.2 min. ; Tiempo de transferencia, 2.2 min.

Aplicación del Método a Muestras Vegetales

El método validado se aplicó a muestras comerciales de naranjas y bananas procedentes de diferentes países, obtenidas en centros comerciales o directamente de cooperativas agrícolas.

Todos los resultados obtenidos en la validación y en la aplicación del método en muestras vegetales se encuentran en el trabajo experimental incluido en este capítulo. Sin embargo, cabe destacar algunos resultados en las muestras analizadas. Como se puede observar en la Figura 3.6, en la mayoría de muestras de naranja se detectó únicamente la presencia de o-fenilfenol ($0.05\text{-}1.76 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$), aunque en ninguno de los casos, los niveles de concentración sobrepasaron al LMR establecido para o-fenilfenol en naranjas ($12 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$).

Por su parte, de las 9 muestras de bananas analizadas, tan sólo se detectó la presencia de bitertanol en tres de ellas. Los niveles de concentración encontrados en las 3 muestras positivas fueron del orden de $0.22\text{-}0.55 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, valores alrededor de 10 veces mayores que el LMR establecido para bitertanol en bananas ($0.05 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$).

El bajo LMR para bitertanol en bananas es posiblemente debido a la falta de ensayos homologados de campo (*residue trials*) con la finalidad de registrar este producto fitosanitario, lo cual conlleva que el LMR se establezca en el límite de determinación del método analítico (generalmente entre 0.01 y 0.05 mg·Kg⁻¹). Aunque el número de muestras ha sido escaso, los resultados obtenidos parecen indicar que en el caso de usar bitertanol, los residuos que quedarían en banana serían siempre superiores al LMR.

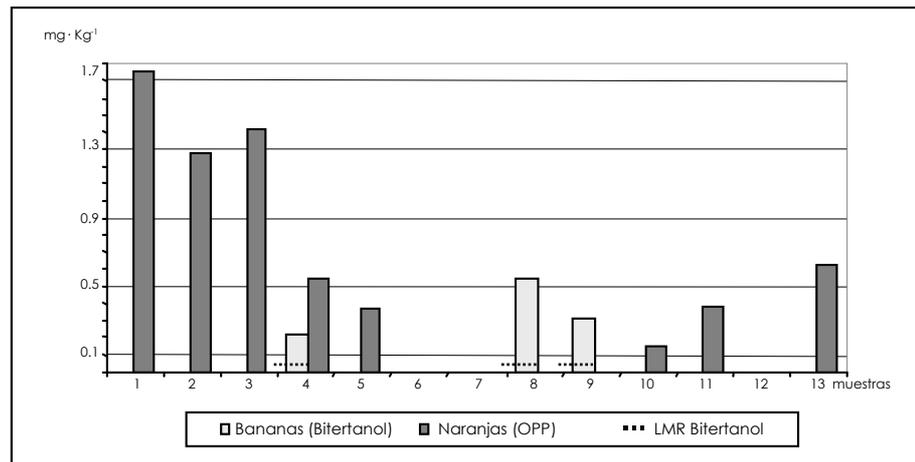


Figura 3.6. Resultados del análisis de muestras mediante el método LC-LC/FD.

Seguidamente se presenta el artículo científico elaborado sobre la determinación de o-fenilfenol y bitertanol en muestras de naranjas y bananas mediante LC-LC. En este documento se describen las características más relevantes del método, así como el procedimiento recomendado, los datos relativos a la validación del mismo y su aplicación a muestras comerciales.

El trabajo presentado lleva por título:

“*Determination of fungicide residues in fruits by coupled-column liquid chromatography*”, Journal of Separation Science (enviado: 14 de enero de 2004)

DETERMINATION OF FUNGICIDE RESIDUES IN FRUITS BY COUPLED-COLUMN LIQUID CHROMATOGRAPHY

T. Zamora, C. Hidalgo, F. J. López, F. Hernández*

Analytical Chemistry, Experimental Sciences Dept., University Jaume I, P.O. Box 8029 AP, Castellón, Spain; E-mail: hernandf@exp.uji.es

Summary

Coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection was applied to the determination of *o*-phenylphenol and bitertanol residues in orange and banana fruits. After extraction with a mixture of acetone, dichloromethane-petroleum ether and ethyl acetate, an extract aliquot of 100 μL was injected directly without any additional clean-up in the chromatographic system using two reversed phase C_{18} coupled columns. The LC-LC approach allowed the automated sample clean up of the vegetal extracts leading to a simple and rapid analytical procedure, with limits of quantification between 0.01-0.05 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Recovery experiments performed on orange and banana samples fortified at different concentrations (0.01-4 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$) gave average recoveries between 70 and 113% with relative standard deviation lower than 15%. The procedure developed was finally applied to orange and banana samples from different geographical locations and the results were confirmed by GC-MS.

Key words

coupled column liquid chromatography, fungicides, *o*-phenylphenol, bitertanol, fruit samples

Abbreviations

LC-LC, coupled-column liquid chromatography; OPP, *o*-phenylphenol; MRL, maximum residues limits

1. Introduction

O-phenylphenol (OPP) and bitertanol are fungicides widely used in different crops. OPP is especially used in citrus for the impregnation of fruit wrappers to inhibit post-harvest microbial decay and for the disinfecting of seed boxes, whereas bitertanol is a systemic fungicide used mainly for control of diseases of fruit and vegetables crops, especially in banana plantations for control of *Sigatoka*. The Maximum Residue Levels (MRL) in Spain for OPP and bitertanol residues are 12 and 0.05 mg Kg⁻¹ in citrus and 0.1 and 0.05 mg·Kg⁻¹ in bananas, respectively¹. These values are in agreement with the European Union levels.

Extraction of fungicides residues from fruit and vegetables produces complex mixtures that often require sample purification and preparation procedures to isolate the targeted fungicides for analysis. Sample clean-up techniques include gel permeation chromatography (GPC)²⁻⁴, liquid-liquid partitioning^{4,5}, adsorption chromatography (silica, Florisil, alumina, carbon)^{2,3}, SPE⁶⁻¹¹, matrix solid phase dispersion (MSPD)¹², etc.

Different multiresidual methods (MRM), including official methods, that are usually very laborious and include several clean up steps, have been proposed for both pesticides, among other fungicides. Most of these methods are based on GC-MS and some of them allow the determination of OPP and/or bitertanol. As an example, the official method for fungicides residues in vegetable and fruit samples in The Netherlands³ includes two clean-up steps by adsorption chromatography on silica gel or alumina and GPC. Recently, Stajnbaher and Zupancic⁶ have proposed a MRM for 90 pesticides (including OPP and bitertanol) based on GC-MS which after extraction with acetone, a SPE step on highly cross-linked polystyrene divinilbenzene was performed. Some samples as oranges required a second SPE on diethylaminopropyl modified silica for removing interferences. LOQ's of 0.02 mg·Kg⁻¹ are reported for OPP and bitertanol.

In general, the application of two clean-up steps in the determination of fungicides MRM is used quite frequently^{2,7-8}. Sannino et al.⁴ proposed a MRM for fungicides in vegetables using ion trap GC-MS after extraction with acetone, liquid-liquid partition with ethyl acetate-cyclohexane and clean up by GPC. The

method was applied to different samples including orange juice, obtaining recoveries lower than 70% for bitertanol at fortification levels of 0.5 and 5 mg·Kg⁻¹.

OPP residues have been determined in citrus fruits and processed citrus products by GC-MS after one step hydrolysis/steam distillation/extraction with isooctane and derivatization with N,N-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide¹³. However, the physico-chemical characteristics of OPP make of this a compound which would be more properly determined by LC, as occurs with the majority of phenols. Thus, Yamazaki and Ninimiya have proposed LC-FD methods for determining OPP residues in oranges⁹ and bitertanol in strawberries¹⁰. Both methods, after sample extraction with ethyl acetate, required a laborious clean up step by passing the extract through solid phase extraction columns (anion exchange and amine bonded silica). In recent years hyphenation of LC and mass spectrometry (LC-MS) has become a powerful tool for pesticide residue analysis due to its inherent selectivity and sensitivity. Some LC-MS methods have been proposed for the determination of fungicide residues, including OPP, in fruits and vegetables^{5,12,14}. Although the clean-up requirements are not as rigorous as other conventional detection system, such as UV or fluorescence, some kind of purification of the extracts is usually required to avoid matrix effects inhibiting.

Our experience with the LC-FD/UV determination of fungicides (carbendazim, thiabendazole, OPP and bitertanol) in orange and banana fruits is that an efficient clean-up step is required and that recoveries for OPP are often low (around 50%), mainly due to its high polarity leading to the breakthrough during the SPE clean-up step. This fact has been also pointed out by Rodriguez et al.¹¹ to justify low recoveries for OPP (around 50%) in a method based on SPE and micellar electrokinetic chromatography for fungicide determination in fruit and vegetables. In the case of orange samples, OPP was not detectable due to the presence of interferent peaks.

The aim of the present paper is to develop a selective LC-LC method for the determination of OPP in fruits making use of the automated on-line clean-up offered by this coupled technique. In addition, as bitertanol has similar chromatographic behaviour to OPP and as both compounds may be used together as fungicides in orange and bananas, the method was developed for

both of them. Multidimensional chromatography can be efficiently applied to solve some of the analytical problems related to the determination of organic compounds in the environment, food and biomedical fields¹⁵. Coupled-column liquid chromatography (LC-LC) has been used in recent years for pesticide residue determination of problematic compounds (mainly ionic or highly polar analytes) in different matrix samples as soil, water and vegetables¹⁶⁻¹⁸. The main advantages of this technique can be summarised as improvement of selectivity, increase of sensitivity (compared to procedures based on conventional LC) and easy automation. A more detailed description of this technique and information about its applications and versatility has been reported by Hogendoorn et al.^{19, 20}.

In the present work, the applicability and advantages of the LC-LC technique for the efficient simultaneous determination of OPP and bitertanol residues in fruit samples (oranges and bananas) are explored.

2. Experimental

2.1. Reagents

O-phenyl phenol and bitertanol standards with purities of 97.0 and 99.0%, respectively, were obtained from Dr. Ehrenstorfer (Promochem, Wesel, Germany) and used without further purification. Stock solutions (approx. 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were prepared in acetonitrile and stored at -18°C . Diluted standard mixtures were prepared in HPLC water and stored at 4°C .

HPLC-grade acetonitrile and methanol were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). HPLC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Nanopure II system (Barnstead, Newton, MA, USA). Dichloromethane, ethyl acetate and n-hexane (ultratrace analytical grade) and acetone (pesticide residue analytical grade) were bought from Scharlab (Barcelona, Spain). Ammonium acetate, sodium hydroxide and o-phosphoric acid (analytical grade) were purchased from Panreac (Barcelona, Spain).

2.2. Equipment

Experiments were performed with an automatic sample processor from Gilson (Villiers-le-Bel, France), which included an ASPEC XL automatic

processor, equipped with two Rheodyne six port valves, a Model 402 low-pressure pump, a 100 μ L loop and a Gilson intelligent keypad.

The LC system consisted of a 9012 ternary LC pump from Varian (Walnut Creek, USA), a Model 2150 isocratic LC pump from LKB (Bromma, Sweden) and an HP 1046A fluorescence detector connected on-line with an HP 1100 series diode-array detector (both from Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany).

LC columns were obtained from Scharlab (Barcelona, Spain). A 30 \times 4 mm i.d. column packed with 5 μ m Kromasil C₁₈ was used as first separation column (C-1) and a 120 \times 4 mm i.d. column packed with 5 μ m Kromasil C₁₈ was used for the analytical determination (C-2).

Recording of chromatograms and quantitative measurements of peak areas were performed with a HP Chem Station for LC 3D System (software version A.05.03).

A high speed blender (Ultraturrax T25, Janke and Kunkel, Germany) was used to homogenise the samples and for extraction. Final extracts with suspended particles were filtered on 0.45 μ m disposable nylon membranes (Osmonics) purchased from Scharlab.

2.3. Procedures

2.3.1. Sample preparation and extraction

Whole oranges and bananas were cut into small pieces, chopped in a speed cutter and stored at -18°C in polyethylene bags if they were not used immediately.

The extraction procedure was as follows: 10 g of chopped crop sample were extracted with 20 mL of acetone and 40 mL of dichloromethane-petroleum ether (1:1) in Ultraturrax for 3 minutes. Afterwards, 40 mL of ethyl acetate were added and the mixture was homogenised in the high-speed blender for a further 3 minutes. Then, the homogenate was filtered into a volumetric flask, adjusting to a final volume of 100 mL with ethyl acetate. An aliquot of 15 mL of extract was concentrated in a water bath (40°C) under gentle nitrogen stream until approx. 5 mL. Then, 2 mL of acetonitrile were added and the evaporation

continued until approx. 2 mL. At this point, a further 2 mL of acetonitrile were added and the extract was evaporated to approx. 1 mL. The extract was diluted to a final volume of 2 mL with HPLC water and filtered over nylon membranes (0.45 μm) before injecting into the LC-LC system.

2.3.2. Sample fortification

Orange samples were fortified at concentration levels of 0.05 and 4 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ by adding to 10 g of triturated sample 125 or 100 μL of OPP standard solution at 4 or 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively.

Banana samples were fortified at different concentration levels (0.01, 0.05 and 1.2 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$) by adding to 10 g of triturated sample 300, 125 or 300 μL of a mixed standard solution of OPP and bitertanol at 0.4, 4 or 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively.

After fortification, the samples were kept at room temperature to equilibrate for approx. 60 minutes prior to extraction.

2.3.3. Chromatographic conditions

Mobile phases M-1 and M-2 used for the determination of OPP in orange samples consisted of 0.01 M ammonium acetate/acetonitrile (70:30, % v/v) and 0.01 M ammonium acetate/acetonitrile (45:55, % v/v), respectively, set at a flow rate of 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

For the determination of OPP and bitertanol in banana samples, M-1 consisted of an ammonium acetate/acetonitrile gradient (Table 1), while 0.01 M ammonium acetate/acetonitrile (40:60, % v/v) was used as M-2. Mobile phases were also set at 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Fluorescence detection was carried out at 343 (OPP) and 329 nm (bitertanol) with excitation at 257 and 224 nm, respectively. When DAD was used, monitoring of OPP and bitertanol was made at 246 and 257 nm, respectively.

Table 1. Mobile phase gradient (M-1) used for the determination of OPP and bitertanol in banana samples.

<i>t</i> (min)	0.01 M CH ₃ COONH ₄ (%)	CH ₃ CN (%)
0.00	60	40
2.50	60	40
2.51	40	60
10.00	40	60
10.01	60	40
12.00	60	40

2.3.4. LC-LC analysis

100 µL of the final sample extract were directly injected into the chromatographic system. The determination of OPP in orange was carried out as follows: after clean-up on C-1 with 3.6 mL of M-1, C-1 was switched on-line to C-2 for 0.6 min to transfer the fraction containing the analyte. After transferring, C-1 was rinsed and conditioned with M-1 and the analytes were separated on C-2 with M-2. The simultaneous determination of OPP and bitertanol in banana was similar to that described above, with the difference of clean-up volume (3.2 mL of M-1) and transfer time (2.2 min).

3. Results and Discussion

Firstly, the excitation and emission spectra of OPP and bitertanol were monitored in order to find the optimum conditions. Then, a LC-LC procedure for the determination of OPP in orange samples was developed in order to obtain a rapid, sensitive and selective method for this compound. Later, the scope of the optimized procedure was enlarged including bitertanol as well, attending to the wide use of this fungicide in bananas.

3.1. Optimisation of LC-LC analysis

The chromatographic separation of analytes was studied by injecting 100 µL of standard solutions to the first column (C-1), directly connected to the fluorescence detector. Acetonitrile was selected as organic modifier and two

different aqueous buffer were assayed, potassium dihydrogen phosphate and ammonium acetate. Finally, 0.01 M ammonium acetate was selected because it did not present problems of precipitation in the LC pump and did not require any adjustment of pH.

With regard to OPP, the use of a mobile phase M-1 with a 30% of acetonitrile led to a clean up time of 3.6 min, which was considered adequate for removing interference with a satisfactory peak shape. On the other hand, a mixture 0.01 M ammonium acetate/acetonitrile (45:55, % v/v) was selected as mobile phase M-2, obtaining a transfer time as small as 0.6 min.

It is well known that selectivity obtained in LC-LC methods is mainly determined by the retention time range of the analytes in the first column: a shorter range will result in an increase of selectivity or, in other words, the best results in terms of selectivity can be expected for the determination of a single analyte. Nevertheless, taking advantage of the similar retention time of the OPP and bitertanol on C-1, the last one was also included in this study, enlarging the scope of the method without significative loss in selectivity.

For the simultaneous determination of both compounds, different gradients were assayed as M-1 in order to obtain good retention of the analytes in the first column and to allow the correct purification of the extract. Also, the mobile phase M-2 had to be appropriate to elute both compounds from the first to the second column and to avoid the band broadening of the analytes on the second chromatographic column. In this way, the step gradient shown in Table 1 was selected as M-1, and 0.01 M ammonium acetate/acetonitrile (40/60, % v/v) was chosen as M-2. Then, when the analytes transfer began from C-1 to C-2 (in minute 3.2) both mobile phases had the same acetonitrile content, this being an ideal situation for working in LC-LC since fluctuations of the base line were avoided.

Using the proposed mobile phases, a clean up time of 3.2 min and a transfer time of 2.2 min were estimated by simply connecting the C-1 column directly to the fluorescence detector (figure 1). As can be seen in Figure 1, the transfer time was increased to 2.2 min in order to prevent small fluctuations in retention time in C-1.

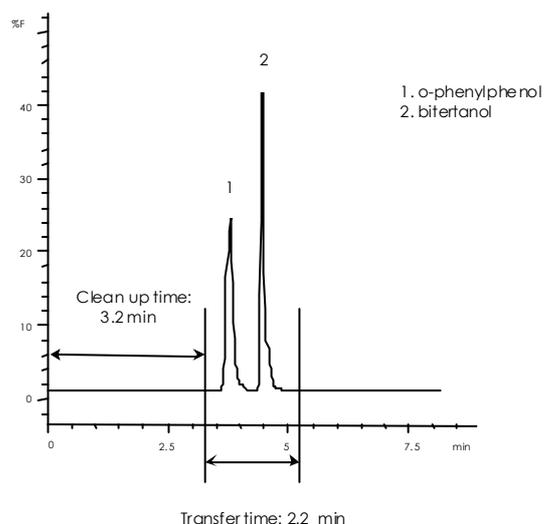


Figure 1. LC chromatogram of a $400 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ *o*-phenylphenol and bitertanol standard mixture solution recorded with C-1 connected to the fluorescence detector. Detection conditions: emission at 343 nm (excitation at 257 nm, from 0 to 4.3 min) and at 329 nm (excitation at 244 nm, from 4.3 to 7.5 min). Chromatographic conditions: see procedure; volume injected, $100 \mu\text{L}$

The linearity of the response for the LC-LC procedure was studied for standard solutions between 4 and $3200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ yielding correlation coefficients better than 0.999 for both compounds. As an example, figure 2A shows the LC-LC-FD chromatogram for a $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ standard solution mixture obtained under the optimised chromatographic conditions.

3.2. Sample treatment

The procedure applied allowed the efficient extraction of both OPP and bitertanol in orange and banana samples, together with other benzimidazole fungicides such as carbendazim and thiabendazole, which are not the object of the present work. Basically, the procedure applied is a well known method for the extraction of benzimidazole fungicides²¹, which was adequately modified in the laboratory to provide satisfactory results in the case of bitertanol and OPP. The mixture of different polarity solvents gives this extraction procedure a clear multi-residue character and allow us to apply it to a mixture of eight fungicides

that can be efficiently determined by GC-MS or LC-FD/DAD (unpublished results).

No significant changes in recoveries were observed when the sample extraction was performed at different periods of time (between 15 and 90 min, mechanically). Finally, extraction and homogenisation were performed in Ultraturrax in two steps (3 + 3 minutes) as shown in "Procedures".

Prior to the injection of the sample extract in the LC-LC system a change of solvent was required. Several experiments were assayed using aliquots of orange extract (15 mL) fortified at $400 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ with OPP, which were evaporated in a water bath (40°C) under a gentle nitrogen stream. This step was critical and we avoided evaporation to dryness, because then important losses of OPP by volatilisation occurred.

Mixtures of methanol:water and acetonitrile:water were checked as final media, and the best results corresponded to acetonitrile media as a higher signal was obtained for OPP. Moreover, no significant changes were observed in the OPP peak as a function of the acetonitrile content in the final extract, in the range assayed of 30-50%. Acetonitrile-water 50:50 (% v/v) was selected as it led to final extracts that appeared more homogeneous.

Then, 2 mL of acetonitrile were added and the evaporation continued until approx. 2 mL. At this point, 2 mL of acetonitrile were added again and the extract was evaporated to approx. 1 mL. The extract was diluted to a final volume of 2 mL with HPLC water and filtered over nylon membranes ($0.45 \mu\text{m}$) before injecting into the LC-LC system.

Using the procedure indicated in "Experimental" no losses occurred for OPP, and it could be applied to banana extracts with satisfactory results.

3.3. Validation of the method

Accuracy and precision of the method were checked by means of recovery experiments in orange and banana samples fortified at different concentration levels. Quantification of the analytes was carried out using fluorescence detector due to its higher sensitivity and selectivity, although diode array detector was also useful for confirmation purposes, since it provided spectral information.

Banana samples were fortified at 0.01, 0.05 and 1.2 mg·Kg⁻¹ with OPP and bitertanol, whereas orange samples were fortified at 0.05 and 4 mg·Kg⁻¹ with OPP. Bitertanol was not assayed in orange as it is not typically used on this crop. Mean recoveries obtained (Table 2) were satisfactory in all cases, ranging between 71 and 113% with RSD corresponding to daily precision values lower than 15%.

Table 2. Recoveries (%), repeatability (%; n=3) and intermediate precision (n=9) achieved for OPP and bitertanol LC-LC-FD determination in fortified orange and banana samples.

Bananas			
		<i>OPP</i>	<i>Bitertanol</i>
<i>0.01 mg·Kg⁻¹</i>			
	Recovery	88	113
	Repeatability	11	13
	Intermediate Precision	13	14
<i>0.05 mg·Kg⁻¹</i>			
	Recovery	95	99
	Repeatability	10	8
	Intermediate Precision	11	9
<i>1.2 mg·Kg⁻¹</i>			
	Recovery	71	107
	Repeatability	4	10
	Intermediate Precision	10	10
Oranges			
<i>0.05 mg·Kg⁻¹</i>			
	Recovery	83	
	Repeatability	5	
	Intermediate Precision	10	
<i>4.0 mg·Kg⁻¹</i>			
	Recovery	95	
	Repeatability	1	
	Intermediate Precision	3	

Intermediate precision was also checked for the case of banana samples at the three fortified levels assayed by analysing 9 replicates on three different days covering a period of a week. Relative standard deviations between 3 and 14% were obtained for both compounds in all cases (Table 2).

Limits of quantification (LOQ), considered as the lowest concentration level that was satisfactory recovered with acceptable precision, were 0.05 mg·Kg⁻¹

(OPP) and $0.01 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (OPP and bitertanol) in orange and banana, respectively. Figure 2B and 2C shows chromatograms for banana and orange samples fortified at the LOQ level. From these chromatograms limits of detection below $0.01 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ can be estimated for both fungicides. The developed LC-LC method was sensitive enough for monitoring these two fungicides in fruits taking into account the maximum residue limits set by European legislation.

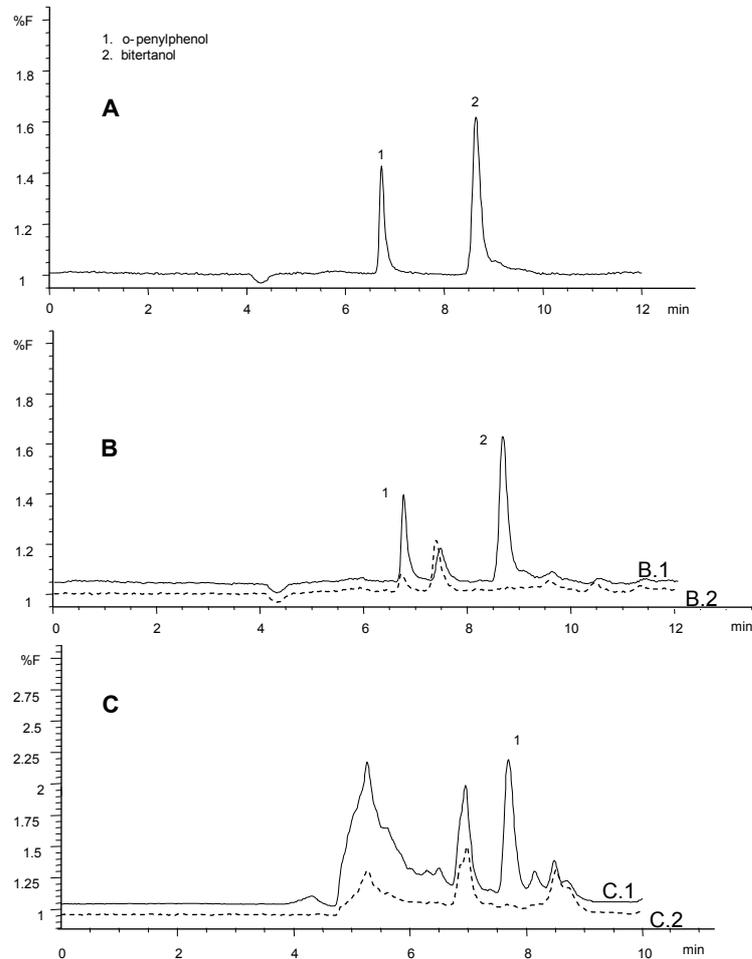


Figure 2. LC-LC-FD chromatograms corresponding to A) $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ standard mixture solution in LC-grade water, B) a banana sample fortified at $0.01 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ with OPP and bitertanol (B.1) together with a banana blank extract (B.2) and C) an orange sample fortified at $0.05 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ with OPP (C.1) together with an orange blank extract (C.2).

3.4. Sample analysis

Oranges and banana samples from different geographical locations (commercial and/or field samples) were analysed by the developed procedure including several quality control (QC) samples. QCs were prepared by spiking blank samples with the analytes at two levels (0.01 and 1.2 mg·Kg⁻¹). QC recoveries were in the range of 70-110% for all analyte/matrix combinations, except for bitertanol (0.01 mg·Kg⁻¹) in bananas, with an average recovery of 116%. As it can be seen in Table 3, OPP was found in most of the orange samples, while it was not detected in bananas samples. Bitertanol was detected in 3 of 9 banana samples analyzed, at concentrations between 0.2-0.5 mg·Kg⁻¹ which are higher than the MRL established in Spain.

Table 3. Concentration levels of OPP and bitertanol (mg·Kg⁻¹) in orange and banana samples.

<i>Oranges</i>		<i>Bananas</i>	
Sample identification	OPP	Sample identification	Bitertanol
1 (c)	1.76	1 (f)	-
2 (c)	1.28	2 (f)	-
3 (c)	1.41	3 (c)	-
4 (c)	0.55	4 (c)	0.22
5 (f)	0.37	5 (c)	-
6 (c)	< 0.05	6 (c)	-
7 (c)	-	7 (c)	-
8 (c)	-	8 (c)	0.55
9 (c)	< 0.05	9 (c)	0.31
10 (c)	0.15		
11 (c)	0.39		
12 (c)	-		
13 (f)	0.63		

Geographical origins: (c) commercial, (f) field

In order to confirm the results obtained, the positive samples (residues above LOQ) were re-analyzed by an alternative multiresidual GC-MS method. All the detections were confirmed by GC-MS showing that the method developed provides satisfactory results. Thus, the appropriate selectivity offered by the LC-LC system allows us to avoid false positives when analyzing real-world samples. Figure 3 shows examples of banana and orange positive samples analyzed by the LC-LC method, and confirmed by GC-MS.

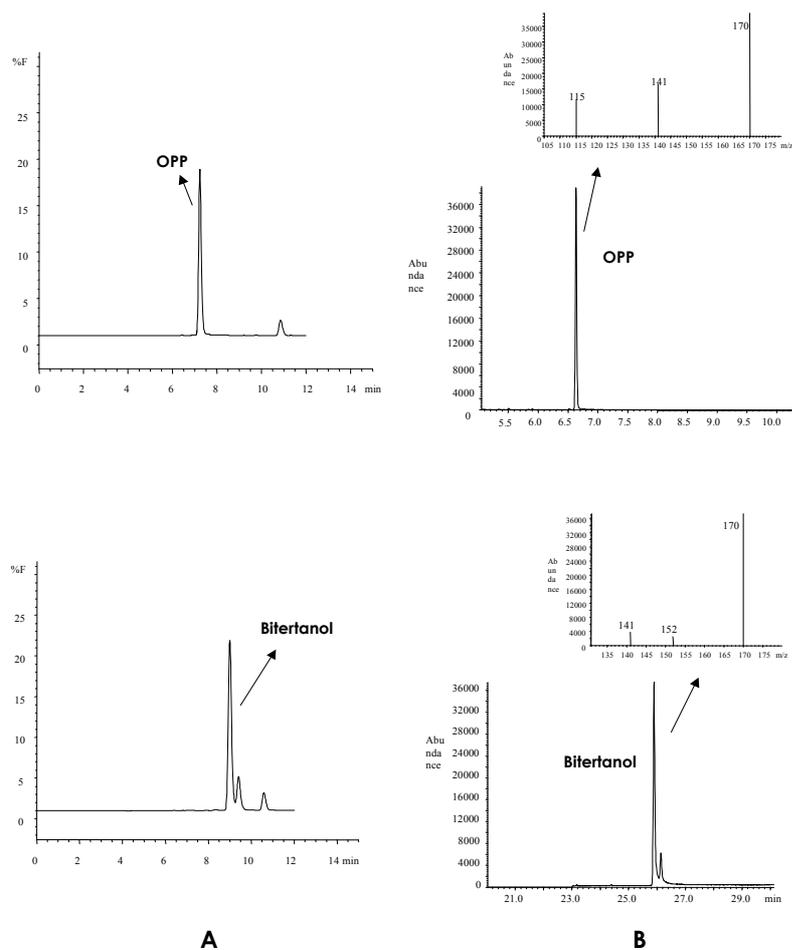


Figure 3. LC-LC-FD chromatograms (A) and GC-MS chromatogram (B)* of the orange sample number 13 (top) containing OPP, and the banana sample number 9 (bottom) containing bitertanol.

* Selected Ion Monitoring (SIM) (extract ion 170 for both compounds)

4. Conclusion

In the proposed method the applicability of the LC-LC technique for the sensitive determination of the fungicides *o*-phenylphenol and bitertanol residues in fruit samples has been proven. The use of two C₁₈ columns allowed the automated clean up of the extracts avoiding additional steps in the analytical procedure and minimising the sample manipulation. Thus, the only sample treatment before the LC-LC analysis was the extraction step and the change of solvent.

The selectivity offered by the LC-LC technique, even using two columns of similar stationary phase, was still satisfactory for raw complex extracts, such as from banana and orange. The efficient removal of matrix compounds by this homomodal LC-LC approach provides a near multidimensional effect, as has been reported previously²⁰.

With a chromatographic run of around 12 min, and limits of quantification of 0.01-0.05 mg·Kg⁻¹ for all analyte/sample combinations tested, the method is rapid, selective and sensitive, and it could be implemented for routine analysis in the laboratory.

References

- 1 www.mapya.es. "Límites máximos de residuos de productos fitosanitarios", Ministry of Agriculture, Fishes and Feeding, Spain, reviewed on 25-06-2003.
- 2 Manual of Pesticides Residue Analysis / DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Pesticides Commission, ed. H. P. Thier and J. Kirchhoff, Germany, 1992, Vol. 2, pp. 77-97.
- 3 Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs, General Inspectorate for Health Protection from the Ministry of Public Health Welfare and Sport, Ed. P. van Zoonen, The Netherlands, 1996, Part 1, pp. 1-22.
- 4 A. Sannino, M. Bandini, L. Bolzoni, J. AOAC Int., 1999, 82, 1229-1238.

- 5 N. Yoshioka, Y. Akiyama, K., Teranishi, J. *Chromatogr. A.*, 2004, 1022, 145-150.
- 6 D. Stajnbaher, L. Zupančič-Zralj, J. *Chromatogr. A.*, 2003, 1015, 185-198.
- 7 J. Fillion, F. Sauvé, J. Selwyn, J. *AOAC Int.*, 2000, 83, 698-713.
- 8 R. Sheridan, J. Meola, J. *AOAC Int.*, 1999, 82, 982-990.
- 9 Y. Yamazaki, T. Ninomiya, J. *AOAC Int.*, 1999, 82, 1474-1478.
- 10 Y. Yamazaki, T. Ninomiya, J. *AOAC Int.*, 1998, 81, 1252-1265.
- 11 R. Rodriguez, Y. Picó, G. Font, J. Mañes, J. *Chromatogr. A.*, 2001, 924, 387-396.
- 12 C. Blasco, Y. Picó, J. Mañes, G. Font, J. *Chromatogr. A.*, 2002, 947, 227-235.
- 13 G. Johnson, S. Harsy, J. Geronimo, J. Wise, J. *Agric. Food Chem.*, 2001, 49, 2497-2502.
- 14 M. Taylor, K. Hunter, K. Hunter, D. Lindsay, J. *Chromatogr. A.*, 2002, 982, 225-236.
- 15 L. Mondello, A.C., Lewis, K.D. Bartle (Editors), *Multidimensional Chromatography*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, 2002.
- 16 J.V. Sancho, C. Hidalgo, F. Hernández, F.J. Lopez, E.A. Hogendoorn, E. Dijkman, *Int. J. Env. Anal. Chem.*, 1996, 62, 53-63.
- 17 F. Hernández, C. Hidalgo, J.V. Sancho, F.J. López, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 3322-3328.
- 18 F. Hernández, C. Hidalgo, J.V. Sancho, *J. AOAC Int.*, 2000, 83, 728-734.
- 19 E.A. Hogendoorn, P. van Zoonen, J. *Chromatogr. A.*, 1995, 703, 149-166.
- 20 E.A. Hogendoorn, P. van Zoonen, F. Hernández, *LC-GC Europe*, 2003, 16, 44-51.
- 21 M. Hiemstra, J.A. Joosten, A. De Kok, J. *AOAC Int.*, 1995, 78, 1267-1274.

4

DETERMINACIÓN DE TRIDEMORF Y
OTROS FUNGICIDAS MEDIANTE
ACOPLAMIENTO LC-MS/MS

4.1. INTRODUCCIÓN

El tridemorf es un fungicida sistémico, introducido en Alemania por BASF en el año 1969. Este compuesto de acción erradicante es absorbido por las hojas y por las raíces, actuando como inhibidor de la biosíntesis del ergosterol, evidenciando además alguna acción protectora. Es utilizado en el control de los hongos *Erysiphe graminis* en cereales, *Mycosphaerella spp.* en bananas y *Caticum solmonicolor* en el té. Además, se utiliza como formulado junto con otros compuestos también de acción fungicida [1].

En Europa, el tridemorf ha sido empleado en Austria, Bélgica, Alemania, Grecia, Italia, Irlanda, Luxemburgo, Holanda, España y en el Reino Unido, siendo en este último el décimo octavo de los plaguicidas más utilizados en la agricultura durante el año 1996 [2]. Además, es ampliamente utilizado en plantaciones de banano en América Latina, especialmente en países como Costa Rica y Ecuador.

Un informe sobre la evaluación del tridemorf publicado por la *United Kingdom Pesticide Safety Directorate* (PSD), señala la preocupación existente sobre los efectos de este compuesto en agricultores expuestos durante periodos de fumigación aérea de cultivos. El documento señala también la poca información de dominio público disponible sobre los efectos en la salud humana y en el medioambiente, considerando que el tridemorf es utilizado en numerosos cultivos en diferentes países del mundo [2].

En información proporcionada por BASF en 1985, se indica posibles riesgos de malformación en niños durante su gestación, cuando las madres estuvieron expuestas al tridemorf mientras trabajaban en el campo. Posteriormente, La PSD determinó en un estudio con ratas, que el tridemorf era capaz de inducir anormalidades como hendidura del paladar durante el desarrollo de los fetos, mientras que en conejos no aparecieron indicios de teratogenicidad. Con los datos disponibles no era posible determinar si los efectos detectados en ratas serían reproducibles en el hombre, por lo cual la misma PSD encontró la necesidad de aplicar un factor de seguridad suficientemente alto (1000) para el establecimiento de valores de ingesta diaria

admisible (ADI). En 1999, este factor de seguridad fue reducido a 500 después de estudios basados en el seguimiento de agricultores expuestos al fungicida [2]. Actualmente, la FAO establece una ADI de $0.016 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, y como niveles de toxicidad se ha fijado un LD50 oral de $480 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ en ratas, y un valor NOEL (2 años) en ratas de $30 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ [1]

De acuerdo con la EPA, este compuesto ha sido clasificado con una toxicidad de grado III, considerado de peligrosa toxicidad para peces y otros animales de vida acuática, y la Organización Mundial de la Salud lo clasifica como moderadamente tóxico (grado II) [1].

Por otra parte, *Health`'s Canadá* no ha registrado el uso de tridemorf en Canadá para efectuar aplicaciones aéreas sobre los cultivos, así como tampoco está autorizado en otros países como Finlandia, Suecia y Dinamarca [3].

Con respecto a los límites máximos de residuos, la Unión Europea, establece como límite máximo de residuos de tridemorf un valor de $0.05 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ en el caso de bananas y naranjas, aunque como ya se ha mencionado anteriormente, este fungicida es de mayor importancia por su aplicación en el cultivo de bananas. La EPA fija un valor tolerable en $0.1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ en bananas, mientras que el Codex no ha publicado resultados sobre residuos de tridemorf en alimentos, ni tampoco sobre la evaluación de la toxicidad de este compuesto [2].

En 1992, en la provincia del Guayas (Ecuador), se detectó la expansión del llamado *Síndrome de Taura*, que afecta en la fase larval a los moluscos, camarones y otros crustáceos con efecto letal. Este fenómeno de mortalidad masiva del camarón afectó a un sector productivo que representaba un poco más del 10% de la capacidad instalada en el país [4]. Según estudios de los laboratorios del sector camaronero, la presencia de fungicidas como el tridemorf en el cultivo de camarón fue la causa del síndrome. Estos productos son utilizados extensamente en bananeras para prevenir la enfermedad Sigatoka Negra [5].

Lo cierto es que el problema suscitado ha traído a colación el tema de la utilización desmesurada de los fungicidas en la agricultura ecuatoriana y la repercusión ambiental que los mismos están provocando.

Por todos los antecedentes antes descritos, es prácticamente una necesidad el desarrollo de una metodología sensible, selectiva y rápida que permita la determinación de estos fungicidas a niveles iguales o menores a los límites máximos de residuos, más aún cuando después de realizar una revisión bibliográfica sobre los métodos de análisis, nos encontramos con escasa información en lo que respecta a la determinación analítica de tridemorf.

A pesar de la importancia del tridemorf por el volumen y la frecuencia de su aplicación en cultivos, sólo hemos podido encontrar un método referenciado propuesto por *el Ministry of Public Health, Welfare and Sports of The Netherlands* basado en la extracción con acetona y determinación espectrofotométrica a 510 nm [6].

Aunque en alguna otra referencia bibliográfica [1] se hace mención de la posible determinación de tridemorf mediante GC-MS, en pruebas preliminares se pudo comprobar que este compuesto no presenta una separación cromatográfica adecuada mediante GC.

El tridemorf se caracteriza por contener en su estructura química un anillo de morfolina, tal y como se puede observar en la figura de la molécula que se adjunta en el artículo científico correspondiente a este capítulo. Aunque se pensaba que el tridemorf era el 2,6-dimetil-4-tridecilmorfolina, en realidad se trata de una mezcla de isómeros de C₁₁-C₁₄, conteniendo mayoritariamente (60-70%) los isómeros del 4-tridecil (C₁₄). Su solubilidad en agua es de 1.1 mg/L a pH neutro y 20°C, soluble, además, en diversos disolventes orgánicos como etanol, acetona, acetato de etilo, ciclohexano, éter dietílico, benceno y cloroformo. Además, es un compuesto estable a ≤50°C y capaz de hidrolizarse rápidamente, en un 50%, por exposición a radiación ultravioleta durante 16.5 h de una disolución acuosa conteniendo 20 mg/Kg [1].

En el presente capítulo se desarrolla un método para la determinación de tridemorf mediante cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas en tandem con interface *electrospray* (LC-ESI-MS/MS). Cabe indicar que, adicionalmente, el método ha sido validado y aplicado para la determinación de otros fungicidas de interés por su utilización en el cultivo de bananas y naranjas, como carbendazima, tiabendazol, imazalil, propiconazol y bitertanol.

El empleo de LC ha sido ampliamente aceptado como técnica preferida para la determinación de compuestos polares y termolábiles en el análisis de residuos de plaguicidas por su efectividad en la separación de los mismos [7]. Recientemente, técnicas de ionización mediante APCI y ESI [8-10] han demostrado su conveniencia para la determinación de varias clases de plaguicidas en frutas y vegetales debido a la alta sensibilidad y estabilidad de la ionización que proporcionan [11]. Aunque algunos de los fungicidas objeto de estudio han sido analizados satisfactoriamente mediante LC-MS usando APCI [12-14] o ESI [14-17], sin embargo, en ninguno de los casos la bibliografía reporta la determinación conjunta de los compuestos seleccionados mediante un método multiresiduos con aplicación de LC-MS. Además, como ya se ha indicado, nuestro trabajo se puede considerar el primero que aborda la problemática de la determinación de residuos de tridemorf en la bibliografía científica.

Referencias

- [1] Tomlin, CDS. (1997), *The Pesticide Manual*, British Crop Protection Council, 11th edition, United Kingdom.
- [2] *Tridemorph*, (1999), Journal Pesticides News, PAN, U.K., disponible en <http://www.pan-uk.org/pestnews/actives/tridemor.htm>, consultado el 3 de septiembre de 2003
- [3] Gallagher, M., McWhirter, C. (1998), *The Nosy Reporter's Corners present "Chiquita secrets revealed" from The Cincinnati Enquirer*, disponible en <http://www.geocities.com/CapitolHill/Lobby/6305/chiquita/>, consultado el 10 de agosto de 2003.
- [4] Bucheli, M. *Ecuador: Verdadera naturaleza del Síndrome de Taura*, INFOPECSA (Centro para los servicios de información y asesoramiento sobre la comercialización de los productos pesqueros en Latinoamérica y el Caribe), disponible en http://www.infopesca.org/cci/cci_doc5.htm, consultado el 1 de agosto de 2003.

- [5] *Diálogo sobre políticas de desarrollo disponible para el caso del síndrome de Taura* (1994), Fundación Futuro Latinoamericano, disponible en www.fulano.org/sindrometaura.htm, consultada el 15 de agosto de 2003.
- [6] *Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuff* (1996), General Inspectorate for Health Protection from Ministry of PublicHealth Welfare and Sport, Ed. P. van Zoonen, The Netherlands, Part 3, pp 1.
- [7] Blasco, C., Picó, Y., Mañes, J., Font, G. (2002), *Determination of fungicide residues in fruits and vegetables by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 947, 227.
- [8] Hernández, F., Sancho, J.V., Pozo, O., Villaplana, C., Ibañez, M., Grimalt, S. (2003), *Rapid determination of Fosetyl-Aluminium residues in lettuce by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry*, J. AOAC Int., 86 (4), 832-838.
- [9] Sancho, J.V., Pozo, O., Zamora, T., Grimalt, S., Hernández, F. (2003), *Direct determination of paclobutrazol residues in pear samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*, J. Agric. Food Chem., 51, 4202.
- [10] Pozo, O., Marin, J.M., Sancho, J.V., Hernández, F. (2003), *Determination of abamectin and azadirachtin residues in orange samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 992, 133.
- [11] Ito, Y., Goto, T., Oka, H., Matsumoto, H., Miyazaki, Y., Takahashi, N., Nakazawa, N. (2003), *Simple and rapid determination of thiabendazole, imazalil, and o-phenylphenol in citrus fruit using flow-injection electrospray ionization tandem mass spectrometry*, J. Agric. Food Chem., 51, 861.
- [12] Blasco, C., Fernández, M., Picó, Y., Font, G., Mañes, J. (2002), *Simultaneous determination of imidacloprid, carbendazim, methiocarb and hexythiazox in peaches and nectarines by liquid chromatography-mass spectrometry*, Anal. Chim. Acta, 461, 109.
- [13] Blasco, C., Font, G., Picó, Y. (2002), *Comparison of microextraction procedures to determine pesticides in oranges by liquid chromatography-mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 970, 201.

- [14] Fernández, M., Rodríguez, R., Picó, Y., Mañes, J. (2001), *Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of post-harvest fungicides in citrus fruits*, J. Chromatogr. A, 912, 301.
- [15] Lacassie, E., Dreyfuss, M.F., Daguet, J.L., Vignaud, M., Marquet, P., Lachâtre, G. (1999), *Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry multiresidue determination of pesticides in apples and pears*, J. Chromatogr. A, 830, 135.
- [16] Taylor, M.J., Hunter, K., Hunter, K., Lindsay, D., Bouhellec, S.L. (2002), *Multiresidue method for rapid screening and confirmation of pesticides in crude extracts of fruits and vegetables using isocratic liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 982, 225.
- [17] Young, M., Early, M., Mallet, C, Krol, J. (2001), *Application of a mixed solid-phase extraction and cleanup procedure for LC/MS determination of thiabendazole and carbendazim in apple juice*, J. AOAC Int., 84 (5), 1608.

4.2. EXPERIMENTAL. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE TRIDEMORF Y OTROS FUNGICIDAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TANDEM (LC-MS/MS)

En términos generales, el método desarrollado consiste en una etapa sencilla de extracción, optimizada después de evaluar diversos disolventes, tras la cual, una alícuota del extracto obtenido se diluye 20 veces antes de su inyección directa en el sistema cromatográfico LC.

La validación del método, tanto en bananas como en naranjas, se realizó mediante el estudio de la linealidad, precisión y exactitud. La cuantificación de los fungicidas se llevó a cabo mediante calibrado en matriz. La exactitud del método se estimó mediante pruebas de recuperación en muestras fortificadas a dos niveles (0.05 y 1 mg·Kg⁻¹), a partir de las cuales se evaluó también la precisión (repetibilidad y precisión intermedia). Además, un estudio de la especificidad del método demostró la ausencia de interferentes en ambas matrices (banana y naranja), gracias a la excelente selectividad que ofrece la espectrometría de masas en tandem. Se determinó también el valor de LOD y LOQ del método.

El método finalmente fue aplicado a muestras reales de bananas y de naranjas de diferente origen, detectándose en las mismas algunos de los fungicidas objeto de estudio.

Los resultados de la optimización, validación y aplicación del método a muestras reales han sido recogidos en el artículo científico que se adjunta en este capítulo de tesis. Sin embargo, algunos datos sobre la optimización del método, no incluidos en el trabajo adjunto, son comentados a continuación.

4.2.1. Optimización de las condiciones de MS

La optimización de las condiciones MS para la determinación de los fungicidas seleccionados se llevó a cabo mediante el estudio de los espectros en full scan y MS/MS obtenidos para cada compuesto. En primer lugar, se

realizaron experiencias de infusión sin aplicar ninguna energía de colisión con el fin de optimizar el voltaje de cono necesario para maximizar la señal de cada analito. Seguidamente, llenando la celda de colisión con argón, se optimizó la energía de colisión necesaria para producir la máxima señal de los fragmentos.

Con el propósito de aumentar la selectividad de los métodos desarrollados, se utilizaron dos transiciones por cada analito. La transición más sensible fue utilizada como transición de cuantificación (Q en la Tabla 4.1), mientras que la menos sensible se utilizó con fines confirmatorios (q en la Tabla 4.1).

De esta manera, una muestra sólo fue considerada positiva si los cromatogramas para las dos transiciones de un mismo compuesto presentaban un pico correspondiente a la misma concentración. Este hecho minimizó la posible aparición de falsos positivos aumentando la fiabilidad de los resultados obtenidos.

La presencia de átomos de nitrógeno básico en todas las moléculas de fungicidas seleccionados aconsejó la utilización de *electrospray* (ESI) en modo positivo para su ionización. En todas las moléculas, el pico base del espectro fue el correspondiente al ión $[M+H]^+$, tal y como se puede ver en las Figuras 4.1-4.5.

Tabla 4.1. Iones (m/z) seleccionados para la detección MS en modo SIM de los fungicidas seleccionados

Fungicida	Ión Precursor (m/z)	Voltaje de Cono (V)	Energía de Colisión (eV)	Ión Producto (m/z)	Tipo de Transición
Carbendazima	192	30	15	160	Q
	192	30	30	132	q
Tiabendazol	202	40	35	175	Q
	202	40	25	131	q
Imazalil	297	35	25	41	Q
	297	35	25	159	q
Tridemorf	298	50	30	130	Q
	298	50	25	98	q
Bitertanol	338	20	10	99	Q
	338	20	15	70	q
Propiconazol	342	40	20	69	Q
	342	40	25	159	q

Q, cuantificación; q, confirmación

Los voltajes de cono, las energías de colisión óptimas, así como los iones precursores e iones productos para las dos transiciones seleccionadas para cada compuesto se muestran en la Tabla 4.1.

Las rutas de fragmentación propuestas para los fungicidas seleccionados se muestran en las Figuras 4.1-4.5, observándose las 2 transiciones utilizadas para la cuantificación y confirmación de los analitos.

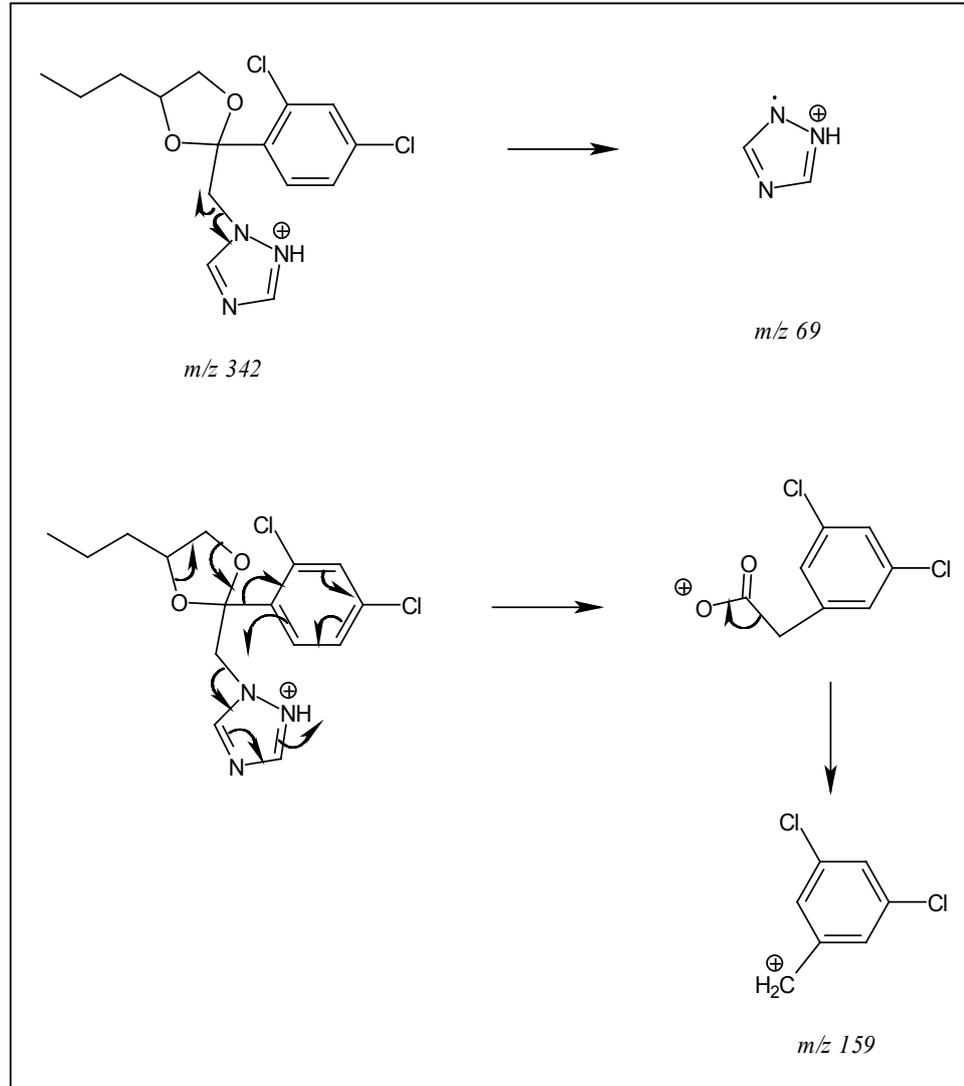


Figura 4.1. Rutas de fragmentación propuestas para propiconazol

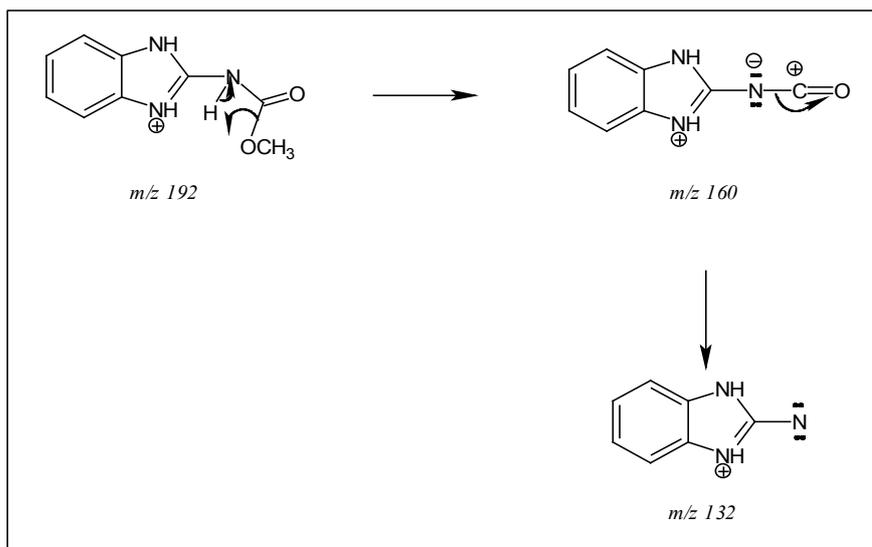


Figura 4.2. Ruta de fragmentación propuesta para carbendazima

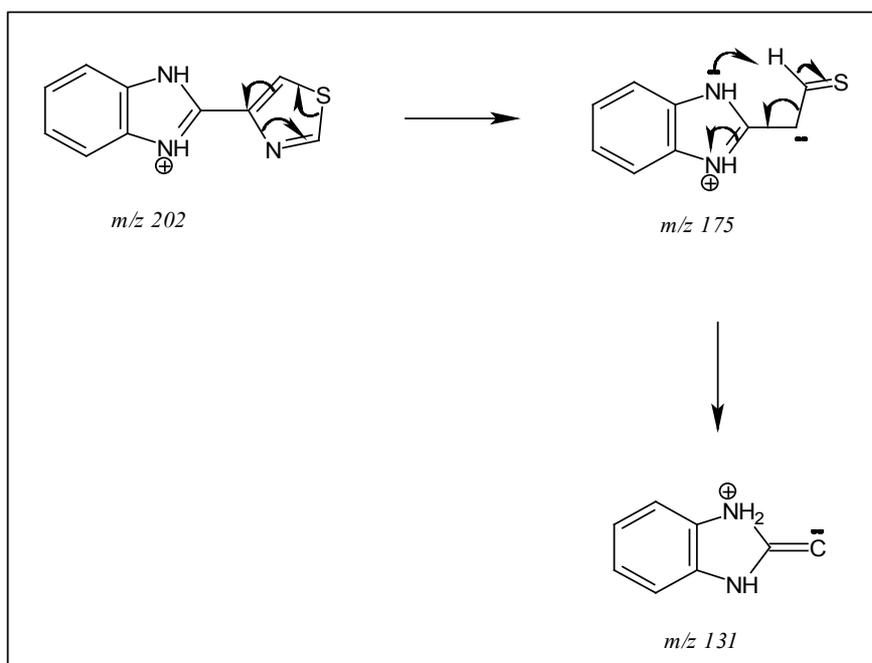


Figura 4.3. Ruta de fragmentación propuesta para tiabendazol

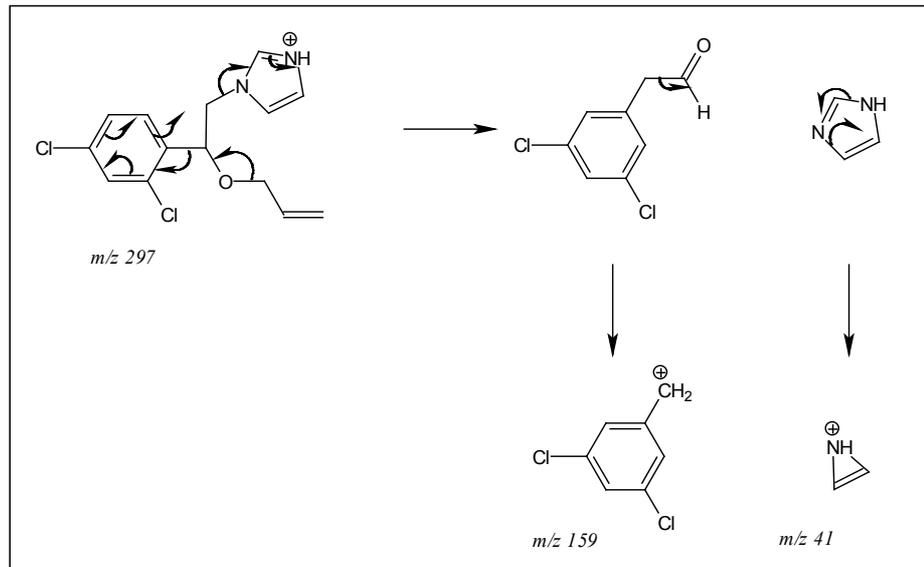


Figura 4.4. Ruta de fragmentación propuesta para imazalil

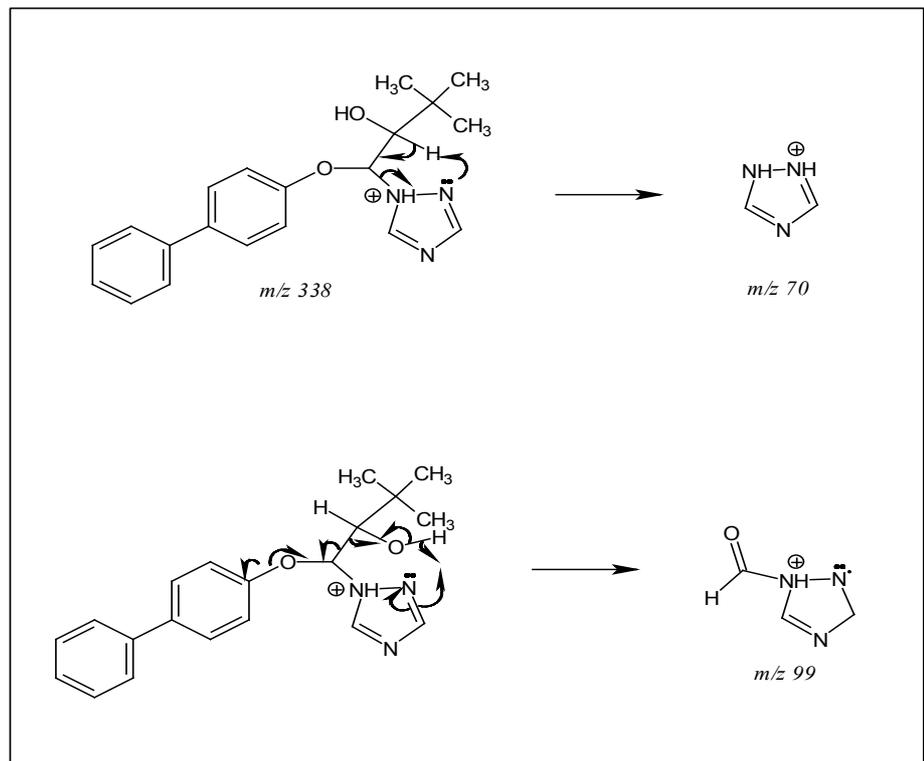


Figura 4.5. Rutas de fragmentación propuestas para bitertanol

4.2.2. Tratamiento de la Muestra

Evaluación del Disolvente de Extracción

Para la etapa de extracción se evaluó el uso de diferentes disolventes como acetonitrilo, metanol y acetona. Acetonitrilo y metanol, a pesar de ser frecuentemente utilizados para la extracción de diversos compuestos y ser eluyentes típicos en LC, sólo permitieron la recuperación satisfactoria (70-95%) de carbendazima, tiabendazol e imazalil, tanto en bananas como en naranjas.

Durante las pruebas de extracción con acetonitrilo se observó una variación en la señal de los compuestos más retenidos (tridemorf, bitertanol y propiconazol), de modo que a pesar de la corrección de la señal con calibrado en matriz para la cuantificación de los resultados, no se obtuvieron recuperaciones satisfactorias en ninguna de las dos matrices vegetales.

Por otro lado, la extracción con metanol en ambas matrices condujo a valores de recuperación aceptables para casi todos los casos, a excepción del tridemorf, del cual se recuperó alrededor del 60% aproximadamente. La Tabla 4.2 muestra los valores de recuperación obtenidos durante las pruebas de extracción con acetonitrilo y metanol.

Tabla 4.2. Recuperación (%) de fungicidas a partir de muestras fortificadas a 1 mg·Kg⁻¹ usando diferentes disolventes de extracción. Determinación por LC-MS/MS

<i>Fungicidas</i>	<i>Acetonitrilo</i>	<i>Metanol</i>
<i>Bananas</i>		
Carbendazima	95	80
Tiabendazol	92	79
Imazalil	90	75
Tridemorf	143	68
Bitertanol	141	77
Propiconazol	145	83
<i>Naranjas</i>		
Carbendazima	91	72
Tiabendazol	90	81
Imazalil	83	79
Tridemorf	54	61
Bitertanol	63	63
Propiconazol	46	82

En todo caso, la extracción con acetona permitió la recuperación satisfactoria de todos los fungicidas seleccionados, con valores entre 70-110% tanto en bananas como en naranjas, tal y como puede observarse en los datos incluidos en el artículo científico.

4.2.3. Aplicación a Muestras Reales

El método desarrollado y validado se aplicó a la determinación de residuos de fungicidas en muestras reales de banana y naranja de diferente procedencia. Algunas muestras de banana procedían de Ecuador dado el interés que teníamos en conocer si existían residuos de fungicidas, especialmente de tridemorf. Los resultados obtenidos en los análisis se encuentran en el artículo adjunto. Cabe destacar que solamente se detectó tridemorf en una muestra de banana, pero a niveles de concentración inferiores al LOQ del método ($0.05 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$), habiéndose estimado un valor del orden de $0.01 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ para este fungicida en dicha muestra (banana 7). Esta muestra procedía de Costa Rica y fue adquirida en un supermercado local.

En cuanto a los resultados para el resto de los fungicidas determinados, se presentan en forma gráfica en las Figuras 4.6 y 4.7, para bananas y naranjas, respectivamente.

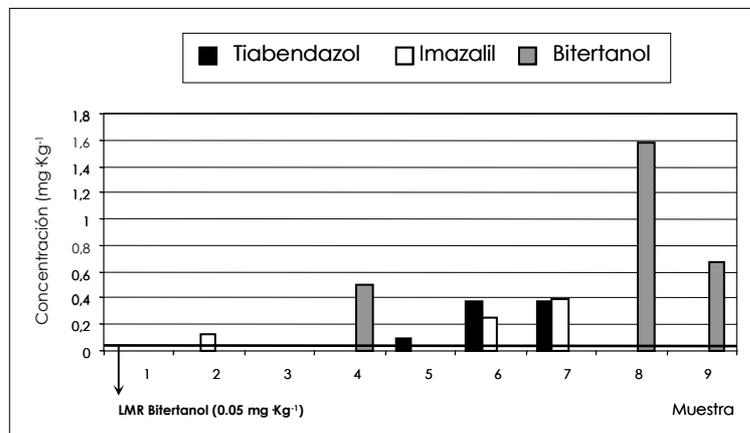


Figura 4.6. Resultados del análisis de muestras reales de bananas mediante LC-MS/MS, con respecto a tiabendazol, imazalil y bitertanol.

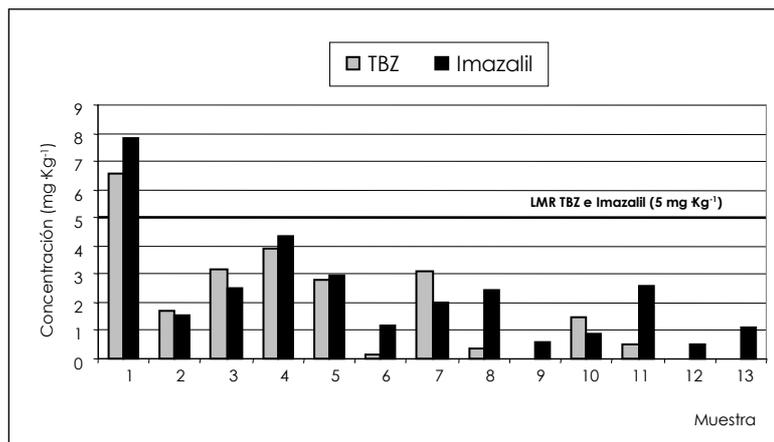


Figura 4.7. Resultados del análisis de muestras reales de naranjas mediante LC-MS/MS, con respecto a tiabendazol e imazalil.

El método desarrollado queda reflejado en el artículo científico que a continuación se adjunta y cuyo título es:

Residue determination of tridemorph and other fungicides in fruit samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A (enviado: 14 de diciembre, 2003)

**RESIDUE DETERMINATION OF TRIDEMORPH AND OTHER
FUNGICIDES IN FRUIT SAMPLES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-
ELECTROSPRAY TANDEM MASS SPECTROMETRY**

T. Zamora, O. Pozo, F. J. López, F. Hernández*

Analytical Chemistry, Experimental Sciences Dept., University Jaume I, P.O. Box 8029 AP, 12071 Castellón, Spain, e-mail: hernandf@exp.uji.es

Abstract

A rapid and sensitive liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) method for the determination of tridemorph in banana and orange samples has been developed, validated and applied to the determination of other pre and post-harvest fungicides (carbendazim, thiabendazole, imazalil, propiconazole and bitertanol) widely used in these crops. Sample preparation included a simple extraction step with acetone by using a high-speed blender previously to the injection of the 5-fold diluted extract into the LC system without any other previous sample treatment. Quantification was carried out using a matrix matched calibration curve which was linear in the range of 1-100 ng·mL⁻¹ for all the compounds. The limit of quantification was 0.05 mg·Kg⁻¹ for all the compounds studied, whereas limits of detection ranged between 0.005 and 0.025 mg·Kg⁻¹ (0.01 mg·Kg⁻¹ for tridemorph). Recoveries for tridemorph from spiked banana and orange samples at 0.05 and 1 mg·Kg⁻¹ were satisfactory, with values between 83 and 99% and relative standard deviations (RSD) lower than 13% (n=5). For the other fungicides, recoveries between 75 and 95% with RSD lower than 12% were obtained. The developed method has been applied for the determination of selected fungicides in real samples of bananas and oranges from different origin.

Key words

Liquid chromatography, tandem mass spectrometry, fungicides, tridemorph, carbendazim, thiabendazole, bitertanol, propiconazole, imazalil, fruit samples.

Introduction

Tridemorph is the common name of the fungicide 2,6-dimethyl-4-tridecylmorpholine. Although originally tridemorph consisted only of tridecyl (C₁₃) isomers, it has become known that the active ingredient in the commercial product is a reaction mixture that comprises C₁₁ to C₁₄ homologues containing 60-70% of 4-tridecyl isomers, 0.2% C₉ and C₁₅ homologues and 5% of 2,5-dimethyl isomers [1]. Tridemorph is a systemic fungicide which provides eradicant action, being adsorbed by the leaves and roots. This compound controls wide range of diseases (yellow and black sigatoka, pink disease, powdery mildew, etc.) of economic importance to plantation (rubber, tea, etc.), field (barley, wheat, etc.), fruit (bananas, mango, etc.), vegetable (curcubits). Tridemorph is applied onto many crops across the world being used widely on banana plantations from Latin America, especially Costa Rica and Ecuador [2]. Tridemorph is usually formulated with the fungicide carbendazim, to extend its spectrum of use in cereal disease control [1].

The Environmental Protection Agency (EPA) has established a tolerance for residues of 2,6-dimethyl-4-tridecylmorpholine in banana samples of 0.1 mg·Kg⁻¹. In Europe, the maximum residue level (MRL) fixed by the European Union Commission for tridemorph residues in both banana and orange samples has been 0.05 mg·Kg⁻¹. Therefore, accurate and sensitive analytical methodology able to determine tridemorph residues in these samples at low ppb level are required. However, very little analytical methods are referenced in scientific literature. As far as we know, only in the Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs proposed by the Ministry of Public Health, Welfare and Sport of The Netherlands, a reference is found on a method that has been applied to the determination of tridemorph residues in grain [3]. This method is based on that proposed by the manufacturer (BASF) and it requires quite a lot of sample handling, including an extraction with acetone, a liquid-liquid

partition, a steam distillation, a treatment with methyl orange and a final extraction with chloroform previously to the spectrophotometric determination at 510 nm. Recoveries between 77 and 103% and a limit of determination of 0.05 mg·Kg⁻¹ are reported. The manufacturer also proposed a GC-MS method for cereal straw and soil, but detailed information is not available.

Thus, the need of analytical methods for determining tridemorph residues in vegetable samples turns out to be evident. Hyphenation of LC and mass spectrometry (LC-MS) has become in recent years in a powerful tool for pesticide residue analysis of foods and vegetables due to its inherent selectivity and sensitivity [4-6]. Obviously, the combination of LC with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), where the formed precursor ion undergoes selective fragmentation achieved by collision-induced dissociation, leads to an improved selectivity and sensitivity making this technique very adequate for analysis at the low residue levels.

Additionally, LC-MS/MS allows to reduce the sample pretreatment steps, such as solvent partitioning or solid phase extraction. Thus, methods published using LC-MS/MS achieve satisfactory results even without making use of cleanup treatments [7-10]. However, in the analysis of complex matrixes, coeluting interferences could inhibit or enhance the analyte ionization, hampering correct quantification [8, 11-15]. This matrix effect depends on the analyte/sample combination and obviously could be likely present when performing direct injection of raw extracts, making the chromatographic optimization crucial in this case.

Confirmation of residues identity in unknown sample is of outstanding importance. Recently, the European Commission, according to the conclusions of a working group designed by the Commission and supervised by four communities reference laboratories (CRLs), has introduced the concept of identification points (IPs) for setting up quality criteria for qualitative methods (or the qualitative part of quantitative methods) [16]. For compounds with an established MRL, a minimum of three IPs are required for satisfactory confirmation of the compound's identity. When LC-MS/MS technique is used with one precursor ion and two products ions (as in this paper), four IPs are earned, fulfilling the requirements of these criteria.

The purpose of this paper was to develop a new rapid, sensitive and selective method for tridemorph residue analysis in banana and orange samples based on direct injection of raw extracts in the LC-EI-MS/MS system, avoiding any type of additional sample treatment except for extraction. The applicability of the method developed was assayed for other pre and post-harvest fungicides (carbendazim, thiabendazole, imazalil, propiconazole and bitertanol) widely used in banana and orange crops, and several real world samples were analyzed in order to evaluate the presence of fungicide residues.

Experimental

Reagents and Chemicals

The 97.0 - 99.8 % fungicide standards (tridemorph, carbendazim, thiabendazole, imazalil, propiconazole and bitertanol) were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Promochem, Wesel, Germany). Individual standard stock solutions (around 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared by dissolving standards in methanol and stored in a freezer at -20°C . Stock solution mixtures were prepared in methanol and stored at 4°C . Working solutions of fungicides used for sample fortification and for injection in the LC system were prepared by diluting stock solutions mixtures in methanol.

LC grade methanol, acetonitrile, and acetone (pesticide residue analysis-grade) were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). LC grade water was obtained by purifying distilled water in a Nanopure II system (Barnstead, Newton, MA). Analytical-grade formic acid (98%) and ammonium acetate were supplied by Scharlab.

Instrumentation

A high-performance liquid chromatography (HPLC) system Waters Alliance 2690 (Waters, Milford, MA, USA) was interfaced to a Quattro LC triple quadrupole mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK). The LC separation was performed using a Nucleosil C_{18} (125×2.1 mm i.d., particle size of 5 μm) (Scharlab), at a flow-rate of $300 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. The mobile phase was a 2.5 mM ammonium acetate in water-0.01% formic acid in methanol gradient in

which the percentage of organic modifier was changed linearly as follows: 0 min, 5%; 2 min, 5%; 14 min, 90%; 16 min, 90%; 17 min, 5%; and 25 min, 5%.

A Quattro LC (quadrupole-hexapole-quadrupole) mass spectrometer with an orthogonal Z-spray-electrospray interface (Micromass) was used. Drying gas, as well as nebulizing gas, was nitrogen generated from pressurized air in a NG-7 nitrogen generator (Alquilo, Etten-Leur, The Netherlands). The nebulizer gas flow was set to approximately 80 L·h⁻¹ and the desolvation gas flow to 800-900 L·h⁻¹. Infusion experiments were performed using a Model 11 single syringe pump (Harvard, Holliston, USA), directly connected to the interface.

For operation in the MS-MS mode, the collision gas was argon 99.995% (Carbueros Metálicos, Valencia, Spain) with a pressure of 1×10⁻³ mbar in the collision cell. Capillary voltages of 3.5 kV were used in the positive ionization mode. The interface temperature was set to 350°C and the source temperature to 120°C. Dwell times of 0.2 s/scan were chosen.

Masslynx NT v 3.5 (Micromass) software was used to process the quantitative data obtained from calibration standards and from samples.

Sample preparation

Whole orange and banana samples were cut into small pieces without any-pretreatment, such as washing or removing their skin, and were triturated. Homogenized sample (25 g) was accurately weighed (precision 0.1 mg) and mixed with 70 mL of acetone. After extraction for 2 min with a high-speed blender Ultraturrax T25 (Janke & Kunkel, Staufen, Germany) at 8000 rpm, the entire extract was filtered through a filter paper and washed with 25 mL of acetone, and the final volume was adjusted to 100 mL with acetone. Then, the raw extract was diluted 5-fold (i.e., a 2 mL aliquot was diluted to 10 mL with LC grade methanol) and a 20 µL aliquot was injected into the LC-ESI-MS/MS system under the experimental conditions described above.

Quantification of samples was carried out by matrix-matched standards calibration prepared from a sample blank.

Validation Study

The matrix-matched calibration curve was obtained by analyzing in duplicate 7 standard solutions at concentrations between 1 and 100 ng·mL⁻¹ for all the compounds. Blank banana and orange samples were extracted accordingly with the sample preparation procedure. A 2 mL aliquot of the acetone sample extract was transferred to a 10 mL volumetric flask, and 1 mL of methanolic mixture standard solutions (fungicide concentration between 10-1000 ng·mL⁻¹) was added. Finally, the volume was adjusted to 10 mL with methanol.

The specificity of the method was evaluated by injecting a procedure blank, orange and banana blank samples, and blank samples spiked at the lowest fortification level assayed, i.e. 0.05 mg·Kg⁻¹. Under these conditions, the response obtained for the blank samples should not exceed 30% of LOQ.

The accuracy of the method was studied by means of recovery assays which were performed at two levels of concentration (0.05 and 1 mg·Kg⁻¹) for all the selected fungicides. Blank orange and banana triturated samples were spiked by delivering appropriate volumes of mixture standard solutions in methanol (between 0.5 and 1 mL). The spiked samples were equilibrated for 1 h prior to extraction, which was carried out accordingly to the procedure described above. Recovery experiments were performed in quintuplicate at every concentration level.

Precision was evaluated by extraction and analysis on the same day of each recovery level and it was calculated in terms of relative standard deviation (RSD) for five replicates.

The limit of detection (LOD), defined as the lowest concentration that the analytical process can reliably differentiate from background levels, was obtained when the signal was three times the average of background noise in the chromatogram at the lowest analyte concentration assayed. The quantification limit (LOQ) was established as the lowest concentration validated that gave acceptable recoveries (between 70 and 100%) and precision (<15 %) [17].

Data evaluation

To ensure the quality of the analysis when processing real-world samples, these were injected in duplicate, and blank samples fortified at two levels (0.05 and 1 mg·Kg⁻¹) were used as a quality control (QC) alternately inserted every six injections. The quantification of the sample list was considered satisfactory if the QC recoveries were in the range of 70-110%. The results in unknown samples were confirmed by means of the two transitions selected for each compound, accepting a value of 0.8-1.2 as ion ratio between the two transitions (see MS Optimization).

Results and Discussion*MS Optimization*

MS optimization was performed by infusion of standard solutions of each individual compound, at a concentration of 5 µg·mL⁻¹, in methanol: water (50:50) at a flow rate of 10 µL·min⁻¹. All compounds presented positive ionization and MS parameters were optimized in order to have at least two transitions with acceptable sensitivity. The most sensitive was selected as quantitative transition and the other one was used as a confirmative transition.

As an example, Figure 1 shows the full scan and the MS/MS spectra for tridemorph. The full scan spectrum (optimized at a cone voltage of 50V) showed an abundant ion at m/z 298 corresponding to the [M+H]⁺ ion obtained from the most abundant C₁₃ isomer, which was selected as precursor ion. Additionally, it can be also seen in Figure 1a the [M+H]⁺ ions corresponding to the less abundant C₁₁, C₁₂ and C₁₄ isomers.

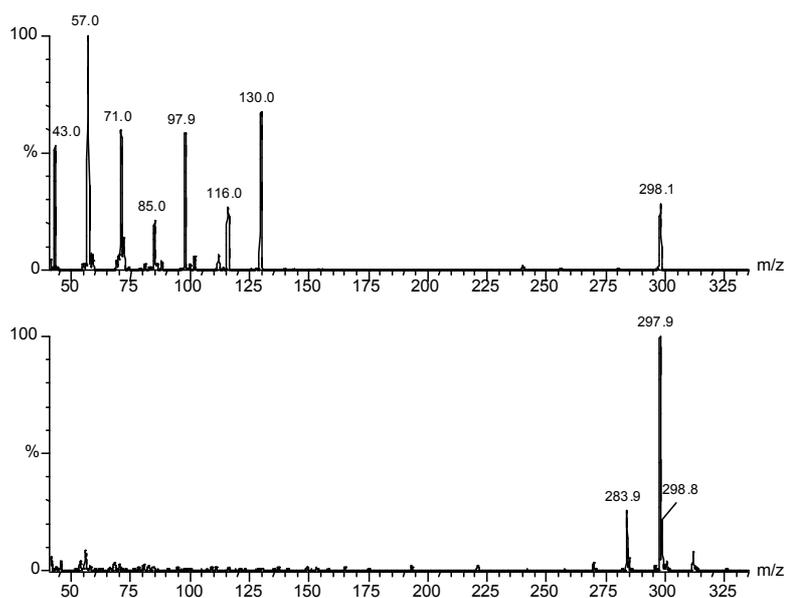


Figure 1. Positive ion electrospray full scan mass spectrum at 50 V (a), and product ion spectra with a collision energy of 35 eV (b), of tridemorph acquired by infusion of 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ standard solution

The MS/MS spectrum presented a major peak at a m/z 130 optimized at a collision energy of 25eV, corresponding this peak to the fragmentation of the tridemorph into the 2,4,6-trimethylmorpholine. By increasing the collision energy to 30eV, several peaks related with the alkyl group fragmentation (m/z 98, 85, 71, 57 and 43) and with fragmentation into the dimethylmorpholine (m/z 116) appeared in the spectra favoring the inclusion of additional transitions (Figure 2). Finally, 298 \rightarrow 130 and 298 \rightarrow 98 were selected as quantitative and confirmative transitions, respectively. In the same way, MS/MS parameters were optimized for all selected fungicides and the results obtained are shown in Table I.

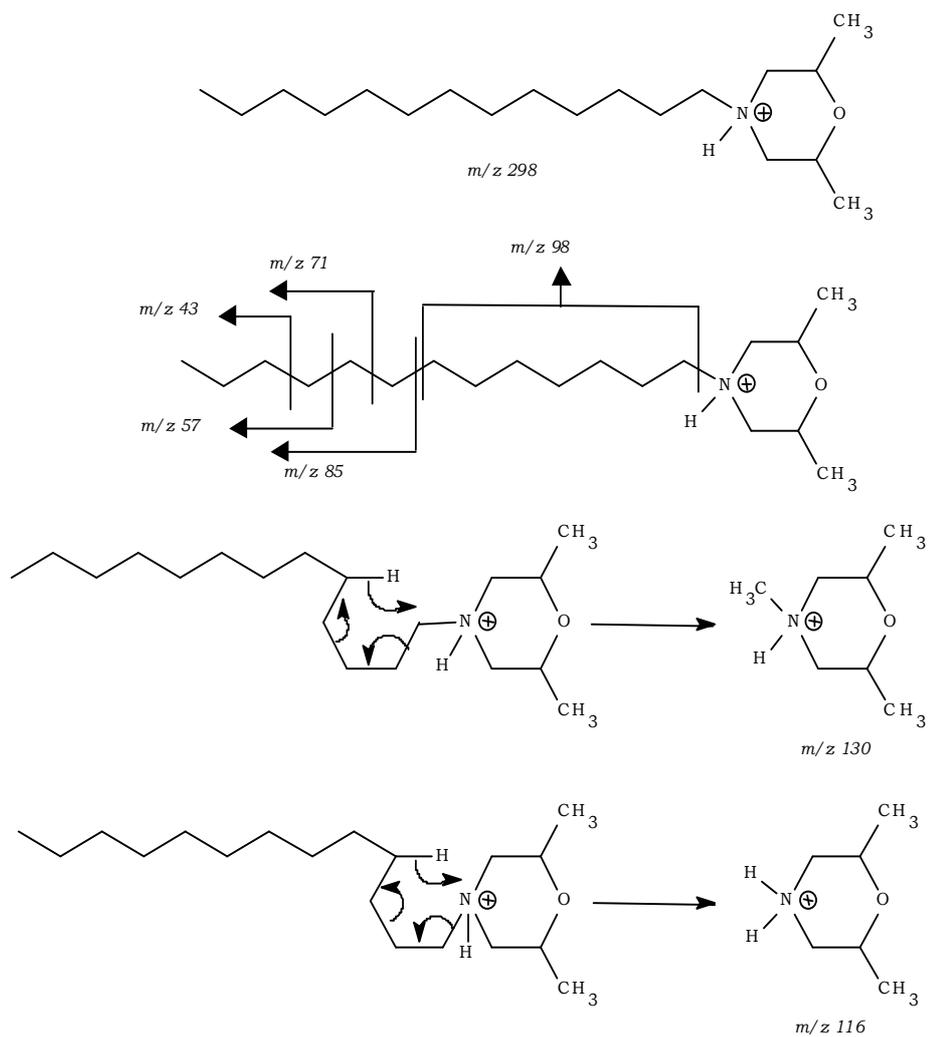


Figure 2. Fragmentation pathways of tridemorph

Table I. Optimized MS/MS parameters for the determination of tridemorph and others fungicides in banana and orange samples.

Fungicides	Cone (V)	Precursor ion (m/z)*	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	
Carbendazim	30	192	Q	160	15
			q	132	30
Thiabendazole	40	202	Q	175	25
			q	131	35
Imazalil	35	297	Q	41	25
			q	159	25
Tridemorph	50	298	Q	130	25
			q	98	30
Bitertanol	20	338	Q	99	15
			q	70	10
Propiconazole	40	342	Q	69	20
			q	159	25

*Q, quantitative transition; q, confirmative transition

LC Optimization

Initially, the mobile phase assayed for the determination of tridemorph consisted of methanol : water mixtures. We proved that the addition of 0.01% formic acid to the mobile phase was necessary to obtain a good peak shape for this compound. However, when we included other fungicides, some of them (carbendazim and thiabendazole) displayed asymmetric peaks (tail peaks), as it can be seen in Figure 3a. A correct peak shape was obtained for these compounds when ammonium acetate was added to the mobile phase instead of formic acid, but the results were not satisfactory for tridemorph under these conditions(Figure 3b).

Moreover, it was observed that compounds which required the presence of ammonium to obtain good chromatographic behavior eluted earlier than tridemorph. Then, we decided to use as mobile phase 2.5 mM ammonium acetate in water-0.01% formic acid in methanol gradient in which the percentage of methanol was increased linearly and, consequently, also the content of formic acid, which was necessary for a good tridemorph peak shape. The use of this gradient allowed fast elution and correct peak shape for all the compounds (Figure 3c).

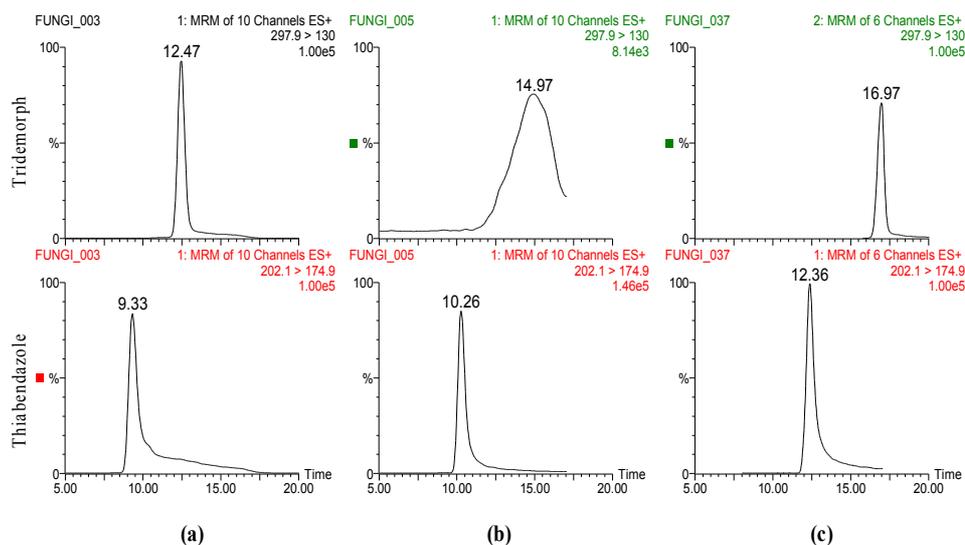


Figure 3. LC-ESI-MS/MS chromatogram corresponding to an orange sample spiked at $0.05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ with carbendazim, thiabendazole, imazalil, tridemorph, bitertanol and propiconazole. Injection with optimized conditions.

Method Optimization

Methanolic extracts of orange and banana sample blanks were spiked with selected fungicides and injected in the LC system, and the signals compared with those obtained from standard solutions in methanol. Response of fortified extracts was substantially lower as a result of ionization suppression from the coextracted components of the matrix. Dilution of the sample extracts with methanol was assayed in order to reduce these interferences. Thus, results obtained for 5-fold diluted extracts were better, but the average signal still was approximately half of the methanolic standards. In order to compensate the matrix effect, the use of matrix-matched calibration was required. All sample extracts (samples analyzed and blank samples used for calibration curves) were diluted 5-fold with methanol, working with cleaner extracts in order to obtain a more robust method and a higher homogeneity between samples from different origin.

With regard to the extraction step, the use of acetonitrile, methanol and acetone was compared. Both, acetonitrile and methanol, provided satisfactory

results for the compounds less retained (carbendazim, thiabendazole and imazalil), but it leads to unacceptable higher signals for the more retained (tridemorph, bitertanol and propiconazole), mainly in banana samples. The extraction with methanol produced the opposite effect in tridemorph, diminishing the signal and leading to recovery values lower than 70% in both matrices. Only the use of acetone provided satisfactory results (recoveries between 70 and 100%) for all compounds, therefore, it was selected as extractant.

In all experiments, the first part of the chromatogram was sent to waste by using the built-in divert valve in the mass spectrometer controlled by the Masslynx software. This solvent delay gave an additional cleanup step, and avoided the overload of the interface with early-eluting interferences that could decrease the analyte ionization.

Method Validation

The optimized method described above was validated for the determination of tridemorph and the other selected fungicides in both banana and orange samples.

Linear calibration curves were obtained for matrix-matched standards of tridemorph in the range 1-100 ng·mL⁻¹, with a correlation coefficient > 0.999 and residuals lower than 30%. With regard to the study of the specificity, no responses were detected for either the procedure blank nor the fruit sample blanks, showing the high specificity of MS-MS detection. The method was found to be precise (RSD < 13%) and accurate, with satisfactory recoveries (83-99%) for both types of fruit samples at the two fortification levels studied. The LOQ corresponded to the lowest fortification level assayed, 0.05 mg·Kg⁻¹, and a LOD as low as 0.01 mg·Kg⁻¹ was estimated for both orange and banana samples from the chromatograms at the lowest concentration level assayed. Table II summarizes data obtained for the validation of the method.

Table II. Mean recoveries (%) and relative standard deviation (%) (n=5) for the analytical procedure. Detection limits.

	Banana samples			Orange samples		
	0.05 mg·kg ⁻¹	1 mg·kg ⁻¹	LOD mg·kg ⁻¹	0.05 mg·kg ⁻¹	1 mg·kg ⁻¹	LOD mg·kg ⁻¹
Carbendazim	83 (6)	84 (7)	0.005	96 (12)	106 (6)	0.005
Thiabendazole	85 (3)	88 (5)	0.005	83 (8)	86 (5)	0.010
Imazalil	81 (5)	81 (5)	0.005	96 (8)	99 (4)	0.010
Tridemorph	83 (13)	93 (9)	0.010	99 (12)	83 (6)	0.010
Bitertanol	75 (9)	96 (12)	0.025	91 (12)	80 (9)	0.025
Propiconazole	76 (5)	93 (2)	0.005	93 (4)	91 (9)	0.005

Satisfactory results were also obtained in the validation for the other fungicides. Response was linear in all cases in the range 1-100 ng·mL⁻¹ (r>0.99) and recoveries varied between 75 and 95%, with RSD always lower than 12%. The LOQ for all compounds studied was set up in 0.05 mg·Kg⁻¹, and the estimated LOD ranged between 0.005 and 0.025 mg·Kg⁻¹ depending on compound and type of sample (Table II).

As an example of the excellent sensitivity and selectivity of the method, Figure 4 shows typical LC-MS/MS chromatograms for a matrix-matched standards solution (2.5 ng·mL⁻¹) and orange sample extracts (blank and fortified at 0.05 mg·Kg⁻¹). From this Figure it can be concluded that lower LOQ could have been established in case that concentrations level below 0.05 mg Kg⁻¹ would have been tested.

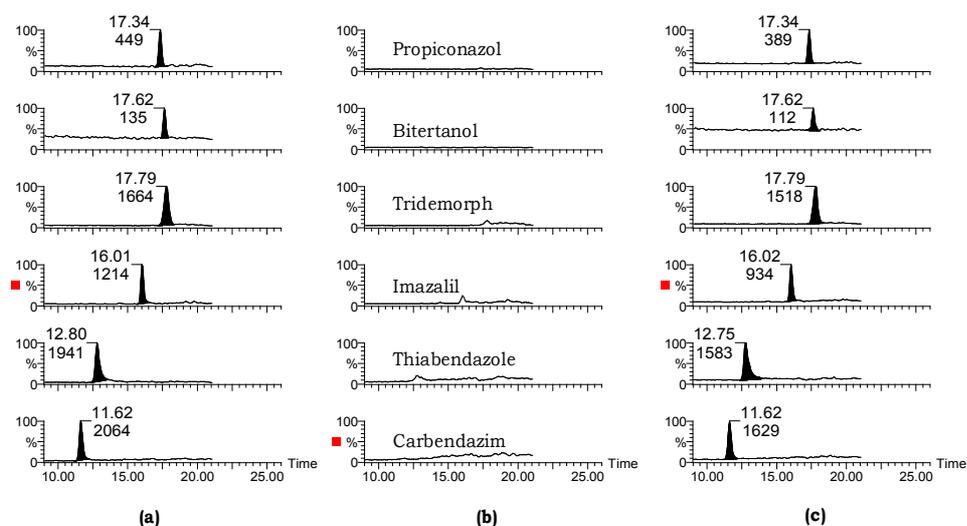


Figure 4. LC-ESI-MS/MS chromatogram corresponding to (a) standard solution at $2.5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, (b) blank orange sample, and (c) an orange sample spiked at $0.05 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ with carbendazim, thiabendazole, imazalil, tridemorph, bitertanol and propiconazole. Injection with optimized conditions.

Analysis of real-world samples

The validated method was applied to the analysis of nine banana samples and thirteen orange samples taken from different local markets. Two of the samples were obtained from a banana plantation at Ecuador. Every three samples (six injections) two QC (one at the LOQ level and the other at the $10 \times$ LOQ level) were inserted. Satisfactory QC recoveries were obtained for all the compounds (between 70 and 110%) demonstrating the robustness of the method. All experiments were made following the spirit of the good laboratory practices (GLP). Results obtained are summarized in Table III.

Table III. Fungicides detected in banana and orange samples (concentration in mg·Kg⁻¹)

Banana Samples				
No. Sample	Thiabendazole	Bitertanol	Imazalil	Tridemorph
1	nd	nd	nd	nd
2	< LOQ	nd	0.13	nd
3	nd	nd	nd	nd
4	nd	0.50	nd	nd
5	0.09	nd	nd	nd
6	0.37	nd	0.25	nd
7	0.37	nd	0.39	< LOQ
8	nd	1.58	nd	nd
9	nd	0.67	nd	nd
Orange Samples				
No. sample	Thiabendazole	Carbendazim	Imazalil	
1	6.58	nd	7.83	
2	1.69	nd	1.58	
3	3.20	nd	2.50	
4	3.89	nd	4.39	
5	2.80	nd	2.93	
6	0.17	nd	1.24	
7	3.10	nd	2.06	
8	0.40	< LOQ	2.56	
9	< LOQ	nd	0.66	
10	1.45	nd	0.90	
11	0.52	nd	2.74	
12	nd	nd	0.42	
13	nd	0.05	1.14	

nd: no detected

In relation to banana samples, positive detection occurred for thiabendazole, bitertanol and imazalil. These three fungicides were found and quantified in three different samples each one. The concentration levels were lower than the Maximum Residue Level (MRL) for thiabendazole and imazalil, but bitertanol exceeded the MLR (0.05 mg·Kg⁻¹) in the three positive samples, reaching values between 0.50 and 1.58 mg·Kg⁻¹. Tridemorph was only detected in one commercial sample, at a level of concentration lower than LOQ. The high

sensitivity of the method and the good figures for tridemorph allowed us to estimate a residue level close to $0.02 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ tridemorph in banana sample number 7.

Tridemorph was not detected in any of the orange samples analyzed. However, typical post-harvest fungicides usually used in citrus crops, as thiabendazole and imazalil, were detected in almost all the samples (100% of samples for imazalil). Concentration levels were lower than MRL ($5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$), except for sample number 1, where residue levels of 6.6 and $7.8 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ were found for both compounds, respectively. Carbendazim was detected in only two samples, and the concentration levels were lower than MRL.

Figure 5 shows the chromatograms corresponding to the banana sample number 7, that contained thiabendazole and bitertanol at concentration level of 0.37 and $0.39 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, respectively. In this sample, tridemorph was also detected at a concentration level close to the LOD ($0.01 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$).

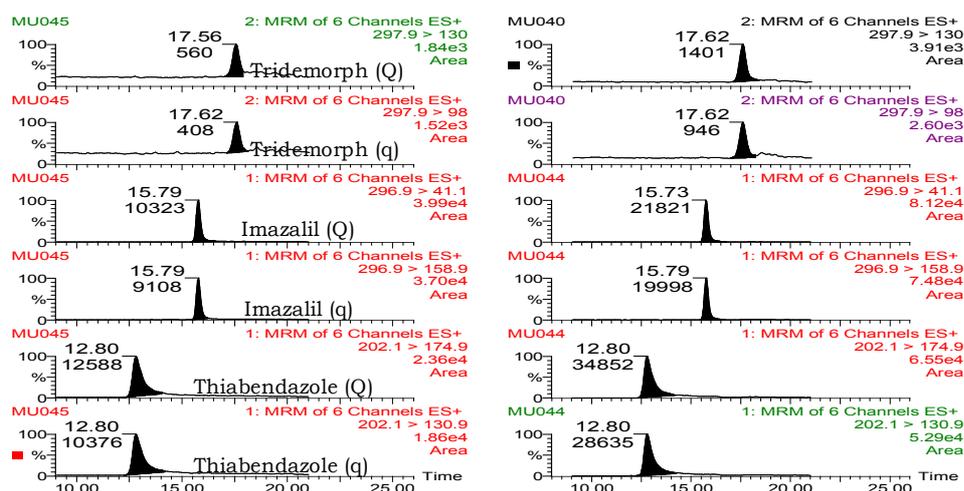


Figure 5. LC-ESI-MS/MS chromatogram corresponding to (a) a real banana sample with detection of thiabendazole ($0.37 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$), imazalil ($0.39 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$) and tridemorph ($< \text{LOQ}$), and (b) standard solution of $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ for tridemorph and $2.5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ for imazalil and thiabendazole.

All the detections were confirmed by the qualification transition (q) selected in each case, obtaining an ion ratio within the accepted tolerance in all cases, even at the low levels found for tridemorph.

Conclusions

This work has shown that LC-ESI-MS/MS is a rapid, sensitive and selective technique for the determination of several fungicides in fruit samples. A method has been developed for the residue determination of tridemorph, fungicide for which analytical methodology is not available in the scientific literature. The method allows the determination of this compound in banana and orange samples without cleanup steps, injecting directly the 5 fold diluted raw extracts in the LC system. This method also gives satisfactory results for other fungicides normally used in banana and citrus crops.

The use of the two MS/MS transitions, one for quantitation and the other for confirmation, together with the high sensitivity reached make of this analytical methodology to be very adequate to monitor the compliance of MRL in Europe and USA, minimising the possibilities to report false positives.

References

- [1] C.D.S. Tomlin (Editor), *The Pesticide Manual*, 11th edition, British Crop Protection Council, Farnham, United Kingdom, 1997, p.1242.
- [2] T.E. Lacher, S.R. Mortessen, R.J. Kendall, *Pesticides Outlook* 6 (1997) 24.
- [3] Ministry of Public Health, Welfare and Sport, General Inspectorate for Health Protection, *Analytical Methods for Pesticide Residue in Foodstuffs*, 6th edition, The Netherlands, 1996.
- [4] D.A. Schwedler, A.D. Thomas, L.T. Yeh, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 5138.
- [5] C. Blasco, Y. Picó, J. Mañes, G. Font, *J. Chromatogr. A* 947 (2002) 227.
- [6] C. Blasco, Y. Picó, G. Font, *J. AOAC Int.* 85 (2002) 704.
- [7] A.C. Hogenboom, M.P. Hofman, S.J. Kok, W.M.A. Niessen, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 379.
- [8] O.J. Pozo, J.M. Marin, J.V. Sancho, F. Hernandez, *J. Chromatogr. A* 992 (2003) 133.

- [9] J.V. Sancho, O.J. Pozo, T. Zamora, S. Grimalt, F. Hernández, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003), 4202.
- [10] F. Hernandez, J.V. Sancho, O.J. Pozo, C. Villaplana, M. Ibáñez, S. Grimalt, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 832.
- [11] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.* 70 (1998) 882.
- [12] J.V. Sancho, O.J. Pozo, F.J. López, F. Henández, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 639.
- [13] J.R. Startin, M.D. Sykes, J.C. Taylor, S.J. Hird, K. Jackson, R.J. Fussell, A.R.C. Hill, *J. AOAC Int.* 83 (2000) 735.
- [14] H.G.J. Mol, R.C.J. van Dam, R.J. Vreeken, O.M. Steijger, *J. Chromatogr. A* 833 (1999) 53.
- [15] M.J. Taylor, K. Hunter, K.B. Hunter, D. Lindsay, S. Le Bouhellec, *J. Chromatogr. A* 982 (2002) 225.
- [16] F. Andre, K.K.G. De Wasch, H.F. De Brabander, S.R. Impens, L.A.M. Stolker, L.van Ginkel, R.W. Stephany, R. Schilt, D. Courtheyn, Y. Bonnaire, P. Fürst, P. Gowik, G. Kennedy, T. Kuhn, J.P. Moretain, M. Sauer, *Trends in Anal. Chem.* 20 (2001) 435.
- [17] European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection, Commission working document SANCO/3029/99, "Residues: Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre-registration data requirements for Annex II and Annex III of Directive 91/414", (2000).

4.3. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES MEDIANTE LOS DIVERSOS MÉTODOS DESARROLLADOS

La aplicación de los diversos métodos desarrollados para el análisis de muestras reales, tanto de bananas como de naranjas, permite llevar a cabo un estudio comparativo de todos los resultados obtenidos, tal como se comenta a continuación.

Se aplicaron los dos métodos multiresiduos desarrollados en esta Tesis, así como el método más selectivo desarrollado para o-fenilfenol y bitertanol (LC-LC/FD). Así mismo, se aplicó el método LC-MS/MS desarrollado y validado para tridemorf y otros fungicidas. Este método también permitió la detección de o-fenilfenol aunque el procedimiento no fue validado para este caso.

La confirmación definitiva de los residuos detectados se llevó a cabo con la técnica de LC-MS/MS, así como con la técnica GC-MS/MS. Esta última sólo con fines de confirmación, ya que el método no se sometió al proceso de validación.

Desde un punto de vista cualitativo, tal y como se muestra en la Tabla 4.3, se ha detectado la presencia de tiabendazol en cuatro muestras de banana. Mientras que imazalil y bitertanol se detectaron en tres muestras. Bitertanol se ha detectado en las tres muestras por los dos métodos multiresiduos aplicados y su presencia se ha confirmado por el método más selectivo LC-LC/FD. Todos los positivos se han confirmado por las dos técnicas empleadas de MS/MS. El imazalil detectado en las tres muestras de banana ha sido confirmado por las dos técnicas de MS en tandem. La menor sensibilidad del método multiresiduos GC-MS sólo ha permitido detectar dos de estos positivos. En cuanto al tiabendazol, en dos de las muestras (banana 6 y banana 7) se identificó mediante los métodos aplicados (a excepción del LC-LC en el que no se determina este fungicida). La técnica LC-MS/MS parece ser la más adecuada y sensible para determinar este fungicida, el cual, únicamente, puede ser detectado por LC-FD a concentraciones superiores a 0.1 mg·Kg⁻¹.

Tabla 4.3. Resultados cualitativos de muestras reales de banana analizadas mediante los diversos métodos desarrollados

	MRM LC-FD	MRM GC-MS	LC-LC/FD	GC-MS/MS	LC-MS/MS
<i>Banana 2</i>					
Tiabendazol	n.d.	n.d.	-	n.d.	x
Imazalil	-	n.d.	-	x	x
<i>Banana 4</i>					
Bitertanol	x	x	x	x	x
<i>Banana 5</i>					
Tiabendazol	x	n.d.	-	n.d.	x
<i>Banana 6</i>					
Tiabendazol	x	x	-	x	x
Imazalil	-	x	-	x	x
<i>Banana 7</i>					
Tiabendazol	x	x	-	x	x
Imazalil	-	x	-	x	x
Tridemorf	-	-	-	-	x
<i>Banana 8</i>					
Bitertanol	x	x	x	x	x
<i>Banana 9</i>					
Bitertanol	x	x	x	x	x

Se han detectado tiabendazol, o-fenilfenol e imazalil en la mayoría de muestras de naranja mediante aplicación de los diferentes métodos analíticos, tal y como puede observarse en la Tabla 4.4. Los resultados son bastante coherentes en cuanto a los positivos detectados y, únicamente, parece ser la sensibilidad el factor limitante, por lo que los métodos menos sensibles no llegaron a detectar algunos de los analitos. Todos los positivos de tiabendazol han sido confirmados por las dos técnicas de MS/MS, a excepción de las muestras 12 y 13 en las que debido a su bajo contenido de tiabendazol, sólo se detectó mediante GC. La menor sensibilidad del método LC-FD frente a GC-MS para este compuesto ha hecho que este fungicida sólo se detectara por el MRM LC-FD para concentraciones $\geq 0.5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Carbendazima únicamente fue detectada en dos muestras mediante la técnica más sensible de LC-MS/MS.

Tabla 4.4. Resultados cualitativos de muestras reales de naranja analizadas mediante los diversos métodos desarrollados

	MRM LC-FD	MRM GC-MS	LC-LC/FD	GC-MS/MS	LC-MS/MS
<i>Naranja 1</i>					
Tiabendazol	x	x	-	x	x
o-Fenilfenol	x	x	x	x	x
Imazalil	-	x	-	x	x
<i>Naranja 2</i>					
Tiabendazol	x	x	-	(a)	x
o-Fenilfenol	x	x	x	(a)	x
Imazalil	-	x	-	(a)	x
<i>Naranja 3</i>					
Tiabendazol	x	x	-	x	x
o-Fenilfenol	x	x	x	x	x
Imazalil	-	x	-	x	x
<i>Naranja 4</i>					
Tiabendazol	x	x	-	x	x
o-Fenilfenol	x	x	x	x	x
Imazalil	-	x	-	x	x
<i>Naranja 5</i>					
Tiabendazol	x	x	-	x	x
o-Fenilfenol	x	x	x	x	x
Imazalil	-	x	-	x	x
<i>Naranja 6</i>					
Tiabendazol	n.d.	x	-	x	x
o-Fenilfenol	n.d.	n.d.	x	n.d.	n.d.
Imazalil	-	x	-	x	x
<i>Naranja 7</i>					
Tiabendazol	x	x	-	x	x
Imazalil	-	x	-	x	x
<i>Naranja 8</i>					
Carbendazima	n.d.	n.d.	-	n.d.	x
Tiabendazol	n.d.	x	-	x	x
Imazalil	-	x	-	x	x
<i>Naranja 9</i>					
Tiabendazol	n.d.	x	-	x	x
o-Fenilfenol	n.d.	n.d.	x	n.d.	n.d.
Imazalil	-	x	-	x	x
<i>Naranja 10</i>					
Tiabendazol	x	x	-	x	x
o-Fenilfenol	x	x	x	x	n.d.
Imazalil	-	x	-	x	x
<i>Naranja 11</i>					
Tiabendazol	x	x	-	x	x
o-Fenilfenol	x	x	x	x	x
Imazalil	-	x	-	x	x
<i>Naranja 12</i>					
Tiabendazol	n.d.	x	-	x	n.d.
Imazalil	-	x	-	x	x
<i>Naranja 13</i>					
Carbendazima	n.d.	n.d.	-	n.d.	x
Tiabendazol	n.d.	x	-	x	n.d.
o-Fenilfenol	x	x	x	x	x
Imazalil	-	x	-	x	x

(a) extracto de muestra no analizado

Por su parte, o-fenilfenol también se ha detectado en la mayoría de las muestras de naranja mediante los métodos multiresiduos y por el método más selectivo LC-LC/FD. En dos de las muestras, la detección de o-fenilfenol fue posible, únicamente, mediante la técnica más sensible y selectiva de LC-LC. Todos los positivos de o-fenilfenol con el método LC-LC desarrollado han sido confirmados por una o las dos técnicas de MS/MS. Esta confirmación únicamente no fue posible en las muestras de naranja 6 y 9, con un contenido de fungicida menor de $0.05 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Cabe indicar que, aunque no se llevó a cabo la validación del método LC-MS/MS para la determinación de o-fenilfenol, sin embargo, la detección de este compuesto en naranjas permitió la confirmación de los resultados obtenidos por los demás procedimientos analíticos aplicados.

El imazalil, debido a sus propiedades fisico-químicas, sólo se analizó por el MRM GC-MS. Todos los positivos se confirmaron por las dos técnicas de MS/MS empleadas.

Finalmente, a modo de resumen cabe señalar que todos los positivos encontrados por los métodos multiresiduos o LC-LC han sido confirmados por una o las dos técnicas de MS en tandem, no habiéndose reportado ningún falso positivo. La mayor sensibilidad LC-MS/MS ha permitido la detección de compuestos que no fueron detectados previamente por los otros métodos.

Desde el punto de vista cuantitativo los resultados relativos a las concentraciones de fungicidas encontrados en las muestras analizadas por los diferentes métodos aplicados se muestran en las Tablas 4.5 (bananas) y 4.6 (naranjas).

En el análisis de bananas, se puede observar la coherencia de los datos cuantitativos para el tiabendazol e imazalil. En este último fungicida, la menor sensibilidad del método MRM GC-MS, únicamente permite indicar que los niveles de imazalil en las dos muestras positivas (banana 6 y 7) son inferiores a $1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, hecho que se ve confirmado por la determinación con LC-MS/MS al haber encontrado concentraciones de 0.25 y $0.39 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, respectivamente. En cuanto al tiabendazol, las concentraciones encontradas en las dos muestras positivas que pudieron ser cuantificadas por los métodos multiresiduos resultaron ser del mismo orden para los tres métodos en las que se incluye su determinación. Una menor coherencia se observa para el fungicida bitertanol, para el cual los datos obtenidos

por los dos métodos MRM y el más selectivo LC-LC/FD son del mismo orden, pero inferiores a los obtenidos por LC-MS/MS, especialmente en banana 8.

Tabla 4.5. Concentraciones obtenidas en muestras reales de banana analizadas mediante los diversos métodos desarrollados

	MRM LC-FD	MRM GC-MS	LC-LC/FD	LC-MS/MS
<i>Banana 2</i>				
Tiabendazol	Nd	nd	nd	< 0.05
Imazalil	-	nd	-	0.13
<i>Banana 4</i>				
Bitertanol	0.20	0.17	0.22	0.50
<i>Banana 5</i>				
Tiabendazol	< 0.2	nd	-	0.09
<i>Banana 6</i>				
Tiabendazol	0.4	0.5	-	0.37
Imazalil	-	< 1.0	-	0.25
<i>Banana 7</i>				
Tiabendazol	0.3	0.5	-	0.37
Imazalil	-	< 1.0	-	0.39
Tridemorf	-	-	-	< 0.05
<i>Banana 8</i>				
Bitertanol	0.50	0.48	0.55	1.58
<i>Banana 9</i>				
Bitertanol	0.30	0.26	0.31	0.67

En las muestras de naranja, los compuestos mayoritariamente detectados fueron, como ya se ha indicado, tiabendazol, o-fenilfenol e imazalil. El o-fenilfenol fue cuantificado mediante tres métodos (los dos multiresiduos basados en GC-MS y LC-FD, y el método LC-LC), ya que el LC-MS/MS únicamente se usó para fines de confirmación en este compuesto. Los resultados comparativos obtenidos en todos los casos positivos para los tres métodos aplicados fueron, en general, coherentes, habiéndose encontrado niveles de concentración del mismo orden. Ahora bien, los datos de las tablas fueron obtenidos sin aplicar factores de corrección debidos a la recuperación. Así, tomando en cuenta que las recuperaciones de o-fenilfenol en naranjas no fueron satisfactorias durante el desarrollo del método multiresiduo LC-FD, se puede apreciar que los valores de concentración obtenidos en muestras reales por este método son algo más bajos que los obtenidos por los demás métodos desarrollados, lo que podría ser debido a las pérdidas observadas durante el proceso de análisis. Sin embargo, la confirmación de la presencia de o-fenilfenol mediante LC-MS/MS demuestra que el método LC-FD podría ser factible de aplicación con propósitos semi-cuantitativos.

Tabla 4.6. Concentraciones obtenidas en muestras reales de naranja analizadas mediante los diversos métodos desarrollados

	MRM LC-FD	MRM GC-MS	LC-LC/FD	LC-MS/MS
<i>Naranja 1</i>				
Tiabendazol	5.5	6.8	-	6.58
o-Fenilfenol	1.3	1.77	1.76	^(a)
Imazalil	-	7.1	-	7.83
<i>Naranja 2</i>				
Tiabendazol	1.3	1.6	-	1.69
o-Fenilfenol	0.8	1.08	1.28	^(a)
Imazalil	-	1.6	-	1.58
<i>Naranja 3</i>				
Tiabendazol	2.5	2.5	-	3.20
o-Fenilfenol	0.7	1.22	1.41	^(a)
Imazalil	-	2.3	-	2.50
<i>Naranja 4</i>				
Tiabendazol	2.3	2.1	-	3.89
o-Fenilfenol	0.4	0.87	0.55	^(a)
Imazalil	-	3.2	-	4.39
<i>Naranja 5</i>				
Tiabendazol	2.0	1.3	-	2.80
o-Fenilfenol	0.5	0.50	0.37	^(a)
Imazalil	-	2.2	-	2.93
<i>Naranja 6</i>				
Tiabendazol	nd	< 0.5	-	0.17
o-Fenilfenol	nd	nd	< 0.05	^(a)
Imazalil	-	1.0	-	1.24
<i>Naranja 7</i>				
Tiabendazol	2.2	1.5	-	3.10
o-Fenilfenol	nd	nd	nd	^(a)
Imazalil	-	1.6	-	2.06
<i>Naranja 8</i>				
Carbendazima	nd	-	-	< 0.05
Tiabendazol	nd	< 0.5	-	0.40
Imazalil	-	1.9	-	2.56
<i>Naranja 9</i>				
Tiabendazol	nd	< 0.5	-	< 0.05
o-Fenilfenol	nd	nd	< 0.05	^(a)
Imazalil	-	1.2	-	0.66
<i>Naranja 10</i>				
Tiabendazol	1.6	1.3	-	1.45
o-Fenilfenol	0.1	0.12	0.15	^(a)
Imazalil	-	1.8	-	0.90
<i>Naranja 11</i>				
Tiabendazol	0.5	< 0.5	-	0.52
o-Fenilfenol	0.2	0.60	0.39	^(a)
Imazalil	-	2.2	-	2.74
<i>Naranja 12</i>				
Tiabendazol	nd	< 0.5	-	nd
Imazalil	-	< 1.0	-	0.42
<i>Naranja 13</i>				
Carbendazima	nd	-	-	0.05
Tiabendazol	nd	< 0.5	-	nd
o-Fenilfenol	0.3	0.42	0.63	^(a)
Imazalil	^(a)	< 1.0	^(a)	1.14

^(a) método no validado para la determinación cuantitativa.

Cuando la concentración de tiabendazol fue superior a $0.5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, éste pudo ser cuantificado por los tres métodos que permiten su determinación (los dos multiresiduos y el LC-MS/MS). En estos casos, los resultados fueron, en general, coherentes para los tres métodos. Cabe destacar la muestra 1 en la que se superó el LMR ($5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$), hecho que fue confirmado por los tres métodos aplicados.

Finalmente, en cuanto al imazalil sólo se determinó por dos métodos (MRM basado en GC-MS y el desarrollado por LC-MS/MS). Con algunas excepciones, como las muestras de naranja 9 y 10, los datos fueron coincidentes por ambos métodos.

En resumen, se demuestra la aplicabilidad de los métodos desarrollados en muestras de naranjas y bananas, confirmándose la idoneidad de los métodos multiresiduos para fines de control (*monitoring*). Para la determinación selectiva de o-fenilfenol se recomienda la aplicación del método LC-LC/FD, más rápido, sensible y selectivo que los multiresiduos. Finalmente, la poderosa técnica LC-MS/MS ha permitido determinar tridemorf y otros fungicidas y, también confirmar los resultados obtenidos con los métodos más convencionales y descartar la existencia de falsos positivos.

Los métodos desarrollados han demostrado su robustez y rapidez, en algunos casos, para la determinación de los residuos de fungicidas seleccionados, sumados a la selectividad y sensibilidad de los mismos. La determinación por LC-MS/MS conlleva el menor tiempo de análisis debido al reducido tratamiento de muestra, consistente únicamente en la extracción de los analitos y dilución del extracto. De igual forma, la omisión de la etapa de purificación *off-line* de la muestra en el método LC-LC, ha permitido acortar el tiempo de análisis, aproximadamente, a la mitad en comparación con los métodos multiresiduos desarrollados por LC-FD y GC-MS que incluyen la purificación de los extractos mediante SPE, con un periodo total de análisis de 2 a 3 horas por muestra. En todos los casos es factible, en promedio, el tratamiento de 6-8 muestras simultáneamente en los métodos multiresiduos dependiendo, en todo caso, de los recursos disponibles en el laboratorio. Este número de muestras podría aumentarse hasta 10-12 muestras cuando se aplica el método LC-LC, y a un número superior si el análisis se realiza por LC-MS/MS.

5

DETERMINACIÓN DE PACLOBUTRAZOL
MEDIANTE ACOPLAMIENTO LC-MS/MS

5.1. INTRODUCCIÓN

Los triazoles constituyen el grupo más importante de compuestos sistémicos, desarrollados en la década de los 60 para control de enfermedades fúngicas en plantas e incluso animales [1]. Un número considerable de derivados estructuralmente relacionados con el triazol se utilizan, además, de manera extensiva en agricultura y horticultura como reguladores del crecimiento vegetal.

El paclobutrazol, compuesto triazólico, comercializado bajo el nombre de Bonzi®, Clipper®, Cultar®, Parlay® o Multeffect®, ha sido objeto de diversas investigaciones como regulador eficaz del crecimiento vegetativo en una amplia gama de cosechas agronómicas y ornamentales [2,3], aunque originalmente fue desarrollado como un fungicida de interesante actividad [4].

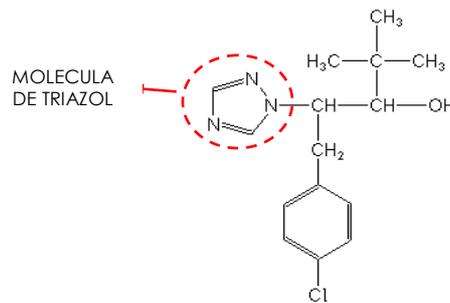


Figura 5.1. Estructura química del paclobutrazol (*((2RS, 3RS)-1-(4-clorofenil)-4,4-dimetil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl) pentano-3-ol)*)

El paclobutrazol induce a una serie de cambios morfológicos, anatómicos, fisiológicos y bioquímicos en plantas debido a la reducción significativa de las reacciones de la hidroxilación requeridas para la biosíntesis de giberelinas y del esteroide. Este compuesto es absorbido por hojas, tallos y raíces, pero más efectivamente cuando es aplicado al suelo, debido a su absorción a través del xilema. Su acción principal es la de reducir entrenudos, evitando el encamado, siendo capaz también de reducir la longitud de brotes anuales, facilitando la poda y recolección; además, el fruto adquiere mucho antes una mayor

intensidad de su coloración y no inhibe la floración [4]. Es por tanto, ampliamente utilizado en árboles frutales (peras y mangos) y en el cultivo de hortalizas para inhibir el crecimiento vegetativo y para mejorar la calidad de la fruta. También es utilizado en el cultivo de plantas ornamentales y florales para el control del crecimiento vegetativo, en el arroz para incrementar su brote y sobre el césped para retardar su crecimiento. Se considera su utilización también para uniformizar las plantas de diferentes edades que son trasplantadas desde los viveros hacia el campo [5].

Se ha comprobado también que compuestos triazólicos, como el paclobutrazol, pueden actuar como protectores vegetales contra las condiciones de estrés ambiental, sequía, temperaturas extremas, etc., lo cual puede explicarse debido a los cambios hormonales que experimenta el vegetal en presencia de estos compuestos [1].

Por otra parte, la aplicación directa de paclobutrazol sobre el suelo cultivado, durante largos periodos, favorece la acumulación de este compuesto, permaneciendo de manera activa durante varios años, lo cual podría afectar seriamente el crecimiento y desarrollo de cultivos posteriores o incluso interactuar de manera peligrosa con microorganismos del suelo. Un estudio sobre los efectos del paclobutrazol sobre microorganismos propios del suelo en una zona dedicada al cultivo de mangos demostró el efecto deletéreo del paclobutrazol sobre la población fúngica de la zona, con una acción fungicida relativamente baja en comparación con la observada sobre bacterias. El estudio sugiere que el efecto diferencial del paclobutrazol podría alterar el balance de la población microbial actuando negativamente sobre la fertilidad del suelo, considerando que microorganismos de diferente carácter coexisten e interactúan entre sí formando una comunidad microbial. Sin embargo, se dice también que el paclobutrazol a dosis recomendadas no debe causar efectos deletéreos en la microflora del suelo [6].

En general, este compuesto presenta baja toxicidad, es considerado no fitotóxico, y no presenta efectos de neurotoxicidad ni tampoco carcinogenicidad, pero puede causar defectos en la reproducción de pájaros adultos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) lo clasifica con un grado de toxicidad III (ligeramente tóxico), estableciéndose además por parte de la FAO un valor de ingesta diaria admisible (ADI) de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de peso corporal [7]. En todo caso,

puede producir irritación de los ojos y del sistema respiratorio por inhalación del compuesto en un ambiente saturado de paclobutrazol, y también puede causar irritación por contacto con la piel.

De este modo, si bien el paclobutrazol ha demostrado ser un eficaz regulador del crecimiento vegetativo, un prometedor protector vegetal contra las condiciones ambientales adversas y un compuesto de interesante actividad fungicida de baja toxicidad, su amplia aplicación en los diferentes cultivos agrícolas y ornamentales merece sin embargo, un seguimiento de los residuos del plaguicida principalmente en los productos de consumo humano, como frutas y vegetales.

En el caso de frutas como la pera, algunos países de la Unión Europea han establecido límites máximos de residuos de paclobutrazol para la seguridad del consumidor. Otros países, como Japón, y organismos como el Codex [8-10], también establecen sus propios valores. Estos límites difieren en un rango desde 0.2 hasta 1 mg·Kg⁻¹, como se puede observar en la tabla 5.1. Cabe indicar, además, que la EPA no contempla valores de tolerancia para paclobutrazol en frutas como peras y manzanas, posiblemente a que su uso no está registrado para estos cultivos. En algunos otros países, como Australia, y en el mismo Codex, los valores de LMR se encuentran referidos en manzanas.

Tabla 5.1. Límites máximos de residuos de paclobutrazol en peras en diferentes países.

<i>País</i>	<i>LMR (mg·Kg⁻¹)</i>
España	0.05
Alemania	0.05
Francia	0.5
Suiza	0.3 ⁽¹⁾
Australia	1 ⁽¹⁾
Japón	0.2
Corea	0.5 ⁽¹⁾
Codex	0.5 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ LMR en manzanas

No son muchos los trabajos realizados sobre la determinación de paclobutrazol. Los métodos desarrollados hacen uso de sistemas cromatográficos convencionales, como GC-NPD [11], GC-MS [12] y LC-UV o DAD [13-17]. Más recientemente se ha desarrollado un método para la

separación quiral de 14 fungicidas triazoles, entre ellos el paclobutrazol, mediante determinación analítica por electroforesis capilar [18].

Generalmente, el tratamiento de muestra de estos métodos suele incluir una etapa de extracción con disolventes orgánicos, como acetato de etilo [15-16], acetona [12], mezclas como metanol 80% en agua [11, 13, 14], o en algún otro caso mediante microdispersión en fase sólida (MSPD) [17], seguida siempre de la purificación de los extractos mediante extracción en fase sólida (SPE) o mediante GPC [18].

El presente capítulo se centra en el desarrollo de un rápido método de análisis que permita la determinación de residuos de paclobutrazol a niveles por debajo de los valores establecidos como LMR por las distintas legislaciones, para lo cual se hace uso del potencial que ofrece el acoplamiento de cromatografía líquida (LC) a un sistema de detección como de espectrometría de masas en tandem (MS/MS), caracterizado por su alta selectividad y sensibilidad. Así, el método se basa en un sencillo procesamiento de la muestra mediante extracción con un disolvente orgánico y la inyección directa de unos pocos microlitros del extracto de muestra en el sistema cromatográfico.

Entre las ventajas del acoplamiento LC-MS/MS hay que destacar también la posibilidad de la inyección directa del extracto en el sistema cromatográfico, evitándose así un procesamiento más largo de la muestra. Su alta sensibilidad permite la cuantificación de los residuos a un nivel incluso de hasta 10 veces por debajo de los valores más bajos establecidos como LMR.

El estudio de la linealidad con disoluciones patrón preparadas tanto en disolvente como en matriz, en un rango de concentración de 0.5-1250 ng·mL⁻¹ (n=13), no evidenció diferencias, demostrando así la ausencia de efecto matriz. Adicionalmente al estudio de linealidad, la validación del método incluyó estudios de precisión y exactitud mediante pruebas de recuperación en muestras blanco de peras fortificadas a tres niveles de concentración, 0.005, 0.05 y 0.5 mg·Kg⁻¹ (n=5). El método finalmente ha sido aplicado a muestras reales procedentes de ensayos de campo con fines de registro (*residue trials*)

El método desarrollado se validó y aplicó en cumplimiento con los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio. El Promotor del Estudio fue la compañía SYNGENTA y el Director del Estudio, el Dr. Juan Vicente Sancho

Llopis, siendo el Director del Laboratorio certificado en BPL (certificado 03/17/BPL22) el Dr. Félix Hernández Hernández.

Referencias

- [1] Berova, M., Zlatev, Z., Stoeva, N. (2002), *Effect of paclobutrazol on wheat seedlings under low temperature stress*, Bulg. J. Plant Physiol., 28 (1-2), 75.
- [2] Khurshid, T., McNeil, D.L., Throught, M.C.T. (1997), *Effect of foliar-applied gibberellins and soil-applied paclobutrazol on fruit quality at harvest and during storage of "Braeburn" apples growing under a high-density planing system*, New Zeland Journal of Crop and Horticulatural Science, 25, 59.
- [3] Gibson, J.L., Whipker, B.E. (2001), *Ornamental cabbage and kale growth responses to daminozide, paclobutrazol and uniconazole*, Horttechnology, 11 (2), 226.
- [4] Barbera, C. (1989), *Pesticidas Agrícolas*, 4ª edición, Ediciones Omega, Barcelona, España.
- [5] Carvajal, E., Alvarado, A., Sterling, F., Rodríguez, J., *Uso del paclobutrazol en clones de palma aceitera durante la etapa de vivero*, disponible en <http://www.asd-cr.com/ASD-Pub/Bol18/B18c4Esp.htm>, consultado el 22 de septiembre de 2002.
- [6] Sugavanum, B. (1983), *Diastereoisomers and enantiomers of paclobutrazol: their preparation and biological activity*, Pestic Science, 15, 296.
- [7] Tomlin, CDS. (1997), *The Pesticide Manual*, British Crop Protection Council, 11th edition, United Kingdom.
- [8] *Pesticide Residue Standards, MRL listings for NZ registered pesticides on selected crops and National MRL Links*, New Zeland Food Safety Authority, , disponible en <http://www.nzfsa.govt.nz/plant/subject/horticulture/residues/#MRL%20Database>, consultado el 26 de septiembre de 2003.
- [9] *Pesticide Residues. Informal coordination of MRLs established in Directives 76/895/EEC, 86/362/EEC, 86/363/EEC, and 90/642/EEC*, (2003), The European Commision, disponible en http://europa.eu.int/comm/food/fs/ph_ps/pest/09-99-2.pdf, consultado el 11 de octubre de 2003.

- [10] Codex Alimentarius: *Pesticide Residues in Food*, (1999), FAO, disponible en http://apps.fao.org/CodexSystem/pestdes/pest_q-e.htm, consultado en 22 de septiembre de 2003.
- [11] Stahly, E.A., Buchanan, D.A. (1986), *Extraction, purification and quantitation of paclobutrazol from fruit tree tissues*, HortScience, 21 (3), 534.
- [12] Stan, H-J. (2000), *Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. State-of-art use of modified DFG-multimethod S19 and automated data evaluation*, J. Chromatogr. A, 892, 347-377.
- [13] Mauk, C.S., Unrath, C.R., Blankenship, S.M. (1990), *Rapid quantitative analysis of a gibberellin-sterol inhibitor (paclobutrazol) using high-performance liquid chromatographic cartridge columns*, J. Plant Growth Regul., 9 (3), 181.
- [14] Mauk, C.S., Unrath, C.R., Blankenship, S.M. (1990), *Development of a strong exchange method for purification and HPLC, assay of gibberellin-sterol inhibitors in plant tissue*, J. Chromatogr. Sci., 28 (12), 621.
- [15] Fussell, R.J., Jackson Addie, K., Reynolds, S.L., Wilson, M.F. (2002), *Assessment of the Stability of Pesticides during Cryogenic Sample Processing. 1. Apples*, J. Agric. Food Chem., 50, 441-448.
- [16] Obana, H., Akusu, K., Okihashi, M., Hori, S. (2001), *Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits using two-layered column with graphitized carbon and water absorbent polymer*, Analyst, 126 (9), 1529-1534.
- [17] Bicchi, C., Cordero, C., Rubiolo, P., Occelli, A. (2001), *Simultaneous determination of six triazolic pesticide residues in apple and pear pulps by liquid chromatography with ultraviolet diode array detection*, J. AOAC Int., 84 (5), 1543.
- [18] Wu, Y.S., Lee, H.K., Li, S.F.Y. (2001), *High-performance chiral separation of fourteen triazole fungicides by sulphated β -cyclodextrin-mediated capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A, 912, 171-179.

5.2. EXPERIMENTAL. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PACLOBUTRAZOL EN PERAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TANDEM TANDEM (LC-MS/MS)

El método desarrollado supuso la rápida optimización de las condiciones cromatográficas para la determinación de paclobutrazol mediante espectrometría de masas en tandem en modo *electrospray* con ionización positiva. Por su parte, el tratamiento de muestra consistió en una sencilla etapa de extracción con metanol y la inyección directa del extracto en el sistema LC.

De esta manera, sólo resta decir que tanto la optimización del método como su validación y la posterior aplicación a muestras reales, se encuentran descritas en el artículo que, a continuación, se presenta:

“Direct Determination of Paclobutrazol Residues in Pear Samples by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry”. (2003), J.V. Sancho, O. J. Pozo, T. Zamora, S. Grimalt, F. Hernández. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4202.

J. Agric. Food Chem. 51, 4202-4206 (2003)

**DIRECT DETERMINATION OF PACLOBUTRAZOL RESIDUES IN PEAR
SAMPLES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-ELECTROSPRAY TANDEM
MASS SPECTROMETRY**

Juan V. Sancho, Óscar J. Pozo, Tatiana Zamora, Susana Grimalt, Félix Hernández*

Analytical Chemistry, Experimental Sciences Department, University Jaume I, E-12071, Castellón, Spain; E-mail: hernandf@exp.uji.es

Received 3 February 2003; revised 9 May 2003; accepted 10 May 2003.

ABSTRACT

A rapid and sensitive liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS-MS) method has been developed for the determination of the plant growth regulator paclobutrazol in pear samples. Extraction was performed with methanol by using a high-speed blender Ultra-Turrax, and 10 μ L of pear extract was directly injected in the LC-ESI-MS-MS system without any previous sample treatment. The highest sensitivity of the method was achieved under MS-MS conditions obtaining a limit of detection of 0.7 μ g/kg and a quantification limit of 5 μ g/kg, with a runtime of only 5.5 min. Recoveries for paclobutrazol from spiked pear samples at 0.005, 0.05, and 0.5 mg/kg were around 82-102% with relative standard deviations between 2 and 7%. The method was applied to real treated and untreated samples of pears, using quality control samples as a evaluation of the method reliability. Two MS-MS transitions were selected, one for quantification (294>70) and the other for confirmation of the analyte (296>70). All the experiments were performed in compliance with good laboratory practices.

KEYWORDS

Paclobutrazol; pesticides; fruit samples; liquid chromatography; tandem mass spectrometry

INTRODUCTION

Paclobutrazol is a plant growth regulator registered for the reduction of terminal growth and pruning volume in trees, the inhibition of gibberellin and sterol biosynthesis, and hence the rate of cell division. (1). The maximum residue limit (MRL) for paclobutrazol in pome fruits is at the sub-ppm level and it has been set up at 0.05 mg/kg in several European countries, as Spain and Germany, while in others is about 10 times higher (between 0.3 and 0.5 mg/kg). When the MRL is established at the low level, a sensitive analytical methodology has to be developed and a limit of quantification (LOQ) of 10 times lower than the MRL would be advisable in order to gain reliability in the results obtained.

Traditionally, gas chromatography (GC) has been the most common technique used for the determination of pesticide residues in fruits, but usually includes time-consuming steps, such as solvent extraction and suitable cleanup steps (2). On the other hand, liquid chromatography (LC) has been applied for polar, thermolabile, or low volatility compounds, and also allows to perform direct injection of raw extracts.

In relation to paclobutrazol, few analytical methods have been reported. A laborious method by GC-NPD for apple tree leaves was published, which involved two cleanup steps by solid phase extraction, a solvent exchange, and preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) in order to obtain recoveries >90%, even using diclobutrazol as internal standard (3). More recently, HPLC-based methods have been published in plant and soil samples (4) and apple and pear pulps (5) using UV detection and different cleanup steps in order to get recoveries $\geq 70\%$ at the 0.01 mg/kg level (5). Thus, using these conventional techniques, it is necessary to perform one or more cleanup steps to decrease interferences and preconcentration steps in order to obtain adequate detection levels.

Nowadays, the LC-MS technique has been applied to residue analysis of polar pesticides in vegetables, due to its inherent benefits in sensitive and selectivity (6, 7). Moreover, LC coupled to tandem MS (MS-MS) has also been applied in this field as a powerful confirmation tool, improving the sensitivity and reducing the sample pre-treatment steps, such as solvent partitioning or

solid phase extraction. Methods published using LC-MS-MS achieve satisfactory results even without making use of cleanup treatments (8, 9). However, in the analysis of complex matrices, co-eluting interferences could inhibit or enhanced the analyte ionization, decreasing or increasing its signal and, therefore, avoiding a correct quantification (9-14). This matrix effect depends on the combination analyte/sample and obviously could be likely present when performing direct injection of raw extracts, if no chromatographic optimization is carried out.

The purpose of this work is to develop a rapid, sensitive and selective method for paclobutrazol residue analysis in pear, avoiding any type of sample treatment except from extraction and, consequently, minimizing the analytical errors associated with this step. The LOQ pursued is 1 order of magnitude lower than the lowest MRL setup in several EU countries. The method has been developed in compliance with good laboratory practices requirements in order to be it applied for registration purposes.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Reagents and Chemicals

Paclobutrazol reference standard was purchased from Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). HPLC grade acetonitrile and methanol were purchased from ScharLab (Barcelona, Spain). LC grade water was obtained by purifying distilled water in a Nanopure II system (Barnstead Newton, MA, USA). Formic acid (98%) was supplied by ScharLab (Barcelona, Spain).

Standard stock solution of paclobutrazol was prepared dissolving 50 mg powder, accurately weighted, in 100 mL of HPLC grade acetonitrile obtaining a final concentration of 500 µg/mL, which was stored at -20°C. Working solutions, used for LC-MS analysis or for sample fortification, were obtained by diluting stock solution with HPLCgrade acetonitrile and with LC grade water for solutions lower than 1 µg/mL.

Sample Preparation

Two type of samples were obtained as follows: commercial samples taken from the market and field samples from residue trials that were treated with paclobutrazol and collected at different times after pesticide application.

Pear samples were cut into small pieces without any pre-treatment, such as washing or removing their skin, and were triturated. Homogenized pear sample (25 g) was accurately weighted (precision 0.1 mg) and mixed with 80 mL of methanol. After the samples were extracted for 2 min with a high-speed blender Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel GmbH & Co., Staufen, Germany) at 8000 rpm, the entire extract was filtered through a filter paper and washed with 15 mL of methanol. Finally, the volume was adjusted to 100 mL with methanol.

To remove solid particles, an aliquot of extract was passed through a 0.45 μm Nylon filter. Then, 10 μL of the methanolic raw extract was directly injected in the LC-MS-MS system.

Fortification of homogenized pear samples was performed by delivering appropriate volumes of standards in acetonitrile (between 0.5 and 2 mL), to yield concentration levels of 0.005, 0.05, and 0.5 mg/kg. These samples were equilibrated, under dark conditions, for 1 h prior to extraction.

LC-Electrospray Ionization (ESI)-MS-MS

A HPLC system Waters Alliance 2690 (Waters, Milford, MA) was interfaced to a Quattro LC triple quadrupole mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) with an orthogonal Z spray electrospray interface. The LC separation was performed by injecting 10 μL and using a Discovery C₁₈ column (50 mm x 2.1 mm i.d. particle size of 5 μm) (Supelco, Bellefonte, PA), by running an isocratic mobile phase consisting of mixtures of acetonitrile:water (35:65, v/v) with 0.01% formic acid in 5.5 min at a flow rate of 300 $\mu\text{L}/\text{min}$.

The drying gas and the nebulising gas were nitrogen generated from pressurized air in a NG-7 nitrogen generator (Aquila, Etten-Leur, NL). The nebuliser gas flow was set to approximately 80 L/h, and the desolvation gas flow to 800-900 L/h. Infusion experiments were performed using a Model 11

single syringe pump (Harvard, Holliston USA), directly connected to the interface.

For operation in MS-MS mode, the collision gas was Argon (99.995%); (Carburos Metálicos, Valencia, Spain) with a pressure of $2 \cdot 10^{-3}$ mbar in the collision cell. Capillary voltages of 3.5 kV were used in positive ionization mode. The interface temperature was set to 350°C and the source temperature was set to 120°C. Dwell times of 0.2 s/scan were selected. A solvent delay of 2 min was chosen in order to have an additional cleanup using the built-in divert valve controlled by the Masslynx software.

Validation Study

The calibration curve was obtained by analyzing in triplicate 13 standard solutions at concentrations between 0.5 and 1250 ng/mL.

The recoveries and the precision were obtained by analyzing paclobutrazol in pear samples spiked at three concentration levels (0.005, 0.05 and 0.5 mg/Kg) and were evaluated within the day in quintuplicate. Additionally, the precision between five days was also estimated at two concentration levels (0.005 and 0.05 mg/kg) in quintuplicate.

The limit of detection (LOD), defined as the lowest concentration that the analytical process can reliably differentiate from background levels, was obtained when the signal was three times the average of background noises of 10 chromatograms at the lowest analyte concentration assayed. The LOQ was established as the lowest concentration assayed which gave acceptable recoveries (>70%) and precision (<15%).

The use of MS-MS detection allowed are to improve the selectivity and led to the unequivocal confirmation of the analyte in the samples analyzed. In the present work, a qualification channel was possible due to the presence of the chlorine atom in the molecule of paclobutrazol, yielding an isotopic ratio $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$ of around 3. For a reliable peak assignment, a 15% tolerance was admitted in the samples analyzed. Besides, the specificity of the method was evaluated, by injecting the procedure blank, a pear sample blank, and a blank sample spiked at the lowest concentration. The response obtained should not exceed 30% of LOQ. Masslynx NT v 3.5 (Micromass) software was used to

process the quantitative data obtained from calibration standards and from pear samples.

Data Evaluation

For quantification of paclobutrazol, two external standard calibration curves were used with at least three points within the calibration range in each set of samples. To ensure the quality of the analysis, samples were injected in duplicate and blank samples fortified at two levels (0.05 and 0.005 mg/kg) were used as a quality control (QC) alternately inserted every four samples. The quantification of the sample list was considered satisfactory if the QC recoveries were in the range 70-110%.

RESULTS

MS Optimization-Infusion Experiments

The full-scan mass spectra and the MS-MS spectra of paclobutrazol are shown in **Figure 1**. They were obtained from infusion of 5 µg/mL solutions (50:50 acetonitrile:water, v:v) at a flow of 10 µL/min. As a result of the basic character of triazol group, paclobutrazol shows positive ionization. The full scan mass spectra presents two peaks at m/z 294 and 296 corresponding to the pseudomolecular ion $[M+H]^+$ with the characteristic isotopic pattern in agreement with the presence of a chlorine atom. The spectrum was optimized at a cone voltage of 40 V.

The MS-MS spectra of paclobutrazol obtained with a collision energy of 20 eV shows only an important fragment at m/z 70 which could be explain by the McLafferty rearrangement showed in **Figure 1**. As the paclobutrazol fragmentation leads to the loss of the chlorine atom, both precursor ions, m/z 294 and 296, share the same fragmentation at m/z 70. Sumarizing, a MS-MS qualification channel and a MS-MS quantification channel were selected at 296>70 and 294>70, respectively, using a cone voltage of 40V and collision energy of 20eV.

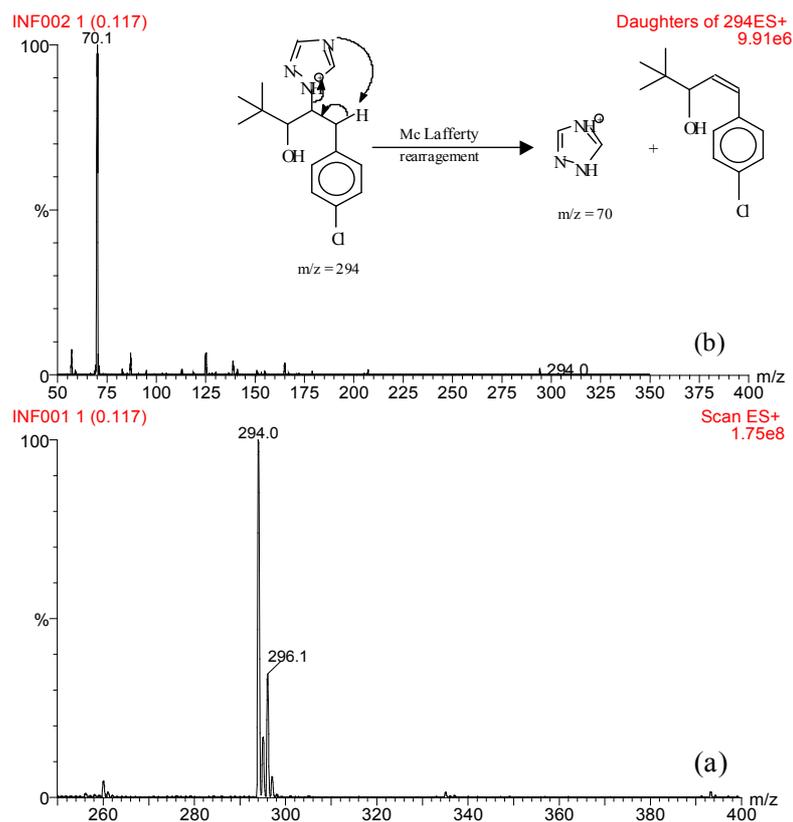


Figure 1. Positive ion electrospray full scan mass spectra (a) and product ion spectra (b) of paclobutrazol acquired by infusion of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ standard solution and proposed fragmentation pathway for paclobutrazol by McLafferty rearrangement.

Extraction Solvent and LC Optimization

Paclobutrazol is very soluble in organic polar solvents (between 100 and 150 g/L at 20°C) (1). To inject the pear extract without any pretreatment or solvent exchange, methanol, one of the most typical organic eluents in LC, was used as extractant.

As the analysis was performed by positive ionization in electrospray mode (ES+), a higher signal could be expected after addition of acid to the mobile phase. However, the concentration of acid should be optimized in order to avoid a signal decrease due to matrix effect. In this paper, we selected 0.01% of formic acid in the mobile phase as a compromise between adequate ionization and matrix effect.

Keeping in mind the rapid determination of paclobutrazol, an isocratic 65:35 water:acetonitrile (v/v) mobile phase was assayed in two columns, Nucleosil C₁₈ and Discovery C₁₈. After direct injection of 10 µL of the methanolic raw extract, good peak shape was obtained only with the Discovery C₁₈ column, which was finally selected for subsequent experiments.

In all experiments, the first part of the chromatogram was sent to waste by using the built-in divert valve in the mass spectrometer controlled by the Masslynx software. This solvent delay gave an additional cleanup step, which avoided the overload of the interface with early-eluting interferences that could decrease the analyte ionization. This simple cleanup, together with the selectivity inherent to the MS-MS technique, led to the adequate quantification by external standards prepared in methanol due to the absence of matrix interference.

Validation Study

Calibration curves showed good linearity between 0.5 and 1250 µg/L, with a correlation coefficient ≥ 0.999 . The method was precise and accurate at the three fortification levels studied. The recovery values as well as the precision within and between days, expressed as relative standard deviation (RSD), are shown in **Table 1**. Data show satisfactory recoveries, between 82-102%, at the three concentration levels assayed and excellent precision with RSD always lower than 10%. The LOQ corresponded to the lowest fortification level assayed, i.e., 0.005 mg/kg, for which satisfactory recovery and adequate precision (RSD < 15%) were obtained. Moreover, a LOD as low as 0.7 µg/kg was estimated (S/N>3) from chromatograms at the lowest concentration level assayed. This very low value illustrates the high sensitivity of MS-MS detection in pesticide residue analysis.

In all experiments performed, both standards and spiked samples, showed an ion ratio ³⁵Cl/³⁷Cl within the accepted tolerance, using the transition 296 to 70 as confirmation channel. In the study of the specificity, no responses were detected for neither the procedure blank or the pear sample blank, showing the high specificity of MS-MS detection.

Table 1. Recovery and precision (as relative standard deviation) of the method at different concentration levels of paclobutrazol in pears (n=5).

Level of fortification (mg/kg)	Repeatability		Intermediate precision
	Recovery (%)	RSD (%)	RSD (%)
0.005	102	6	9
0.05	90	2	8
0.5	82	7	(*)

(*) Not assayed.

Typical LC-MS-MS chromatograms of standard solutions and pear sample extracts (blank and fortified at the lowest level assayed) are shown in **Figure 2**. They were obtained after direct injection of a raw extract sample with a total chromatographic run of only 5.5 min.

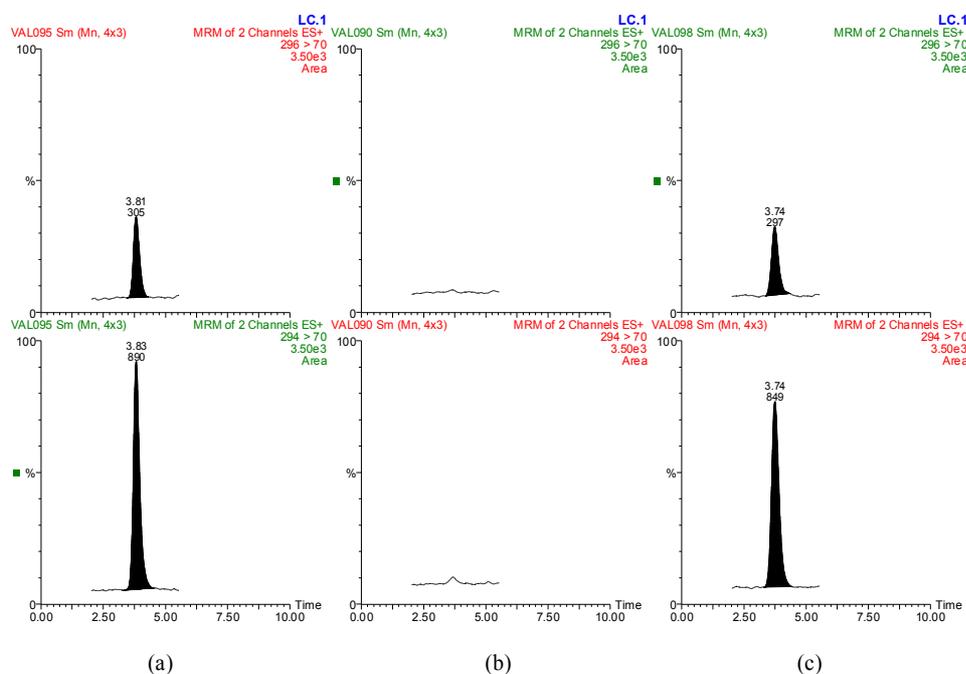


Figure 2. LC-ESI-MS-MS chromatograms for (a) standard (1.25 µg/L) (b) blank pear sample and (c) pear sample fortified at 0.005 mg/kg with paclobutrazol. Top, confirmation channel (296>70), and bottom, quantification channel (294>70).

Application to the Method to Real Pear Samples

The validated method was applied to 48 pear samples: eight commercial samples taken from the market and 40 samples from field residue trials. Every six samples, two QC, were inserted (one at the LOQ level and the other at the 10 x LOQ level) obtaining an overall response between 79 and 106%, demonstrating the robustness of the method. All experiments were made in compliance with good laboratory practices.

Paclobutrazol was not detected in any of the commercial samples analyzed, while treated samples presented different concentration levels/according to the collection date after application in the field. As an example, **Figure 3** shows a blank sample (**Fig. 3a**) and a positive sample containing paclobutrazol at a level very close to the LOQ (concentration found 5.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (**Fig. 3b**). As it can be seen, the presence of paclobutrazol was satisfactorily confirmed at these low concentration levels, using the transition 294>70.

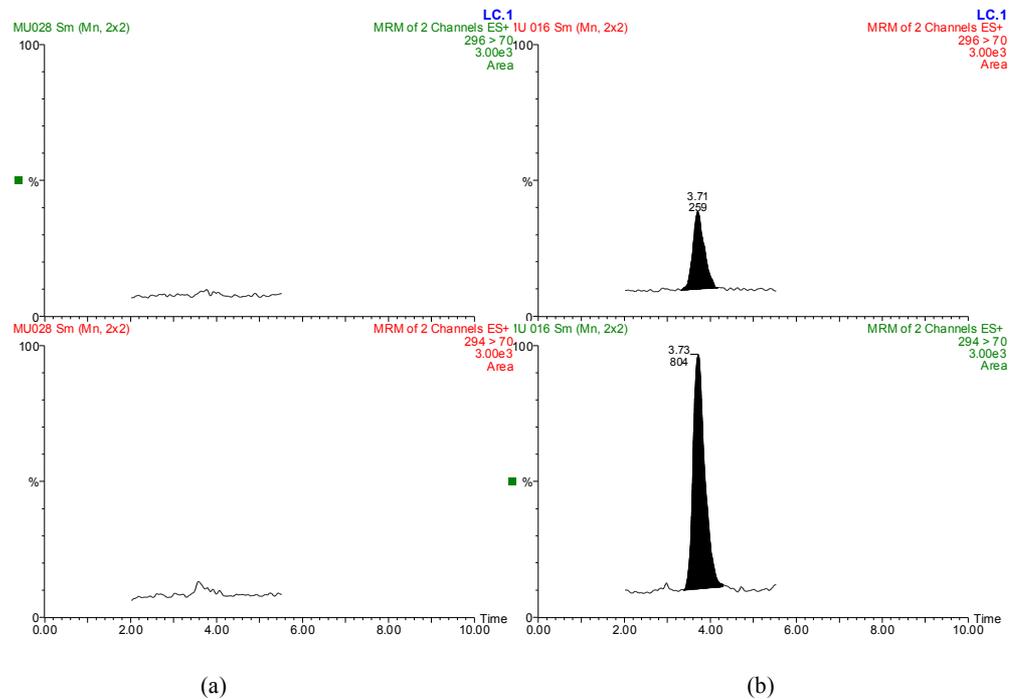


Figure 3. LC-ESI-MS-MS chromatograms corresponding to the residue analysis of (a) commercial pear sample and (b) field sample that contained 5.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of paclobutrazol. Top, confirmation channel (296>70), and bottom, quantification channel (294>70).

CONCLUSION

This work has shown that LC-ESI-MS-MS is a powerful analytical technique for the rapid determination of paclobutrazol residues in pear samples. The high selectivity and sensitivity of LC-MS-MS allow the direct injection of the raw methanolic extracts achieving a detection limit 80 times lower than the MRL set up for this pesticide in pome fruits in several European countries. The isocratic separation on a Discovery C18 column permits the correct quantification without matrix effects as well as short chromatographic runs of only 5.5 min, rendering a throughput of around 250 samples/day. The method was validated and implemented for routine analysis of pears in compliance with good laboratory practices, demonstrating its speediness and robustness.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to the Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for using the Quattro LC triple quadruple mass spectrometer and to Syngenta Agro S.A. for providing field treated samples.

REFERENCES

- [1] The Pesticide Manual, 11th ed.; British Crop protection Council: Farnam, UK., 1997.
- [2] Stan, H-J. Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection State-of-the-art use of modified DFG-multimethod S19 and automated data evaluation. *J. Chromatography A*, **2000**, *892*, 347-377.
- [3] Stahly, E.A.; Buchanan, D.A. Extraction, purification and quantitation of paclobutrazol from fruit tree tissues. *HortSci*. **1986**, *21(3)*, 534-535.
- [4] Mauk, C.S.; Unrath, C.R.; Blankenship, S.M.; Rapid quantitative analysis of a gibberellin-sterol inhibitor using high-performance liquid-chromatographic cartridge columns. *J. Plant Growth Regul.* **1990**, *9(3)*, 181-184.

- [5] Bicchi, C.; Cordero, C.; Rubiolo, P.; Occelli, A. Simultaneous determination of six triazolic pesticide residues in apple and pear pulps by liquid chromatography with ultraviolet diode array detection. *J. AOAC Int.* **2001**, *84*(5), 1543-50.
- [6] Schwedler, D.A.; Thomas, A.D.; Yeh, L.T.; Determination of spinosad and its metabolites in food and environmental matrices by Liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*(11), 5138-5145.
- [7] Hernández, F.; Hidalgo, C.; Grimalt, S.; Sancho, J.V.; Application of column-switching liquid chromatography to the determination of polar herbicides in different environmental matrices. MCPA as a case study. *Quím. Anal.* **2001**, *20*, 81-91.
- [8] Hogenboom, A.C.; Hofman, M.P.; Kok, S.J.; Niessen, W.M.A.; Brinkman U.A.Th. Determination of pesticides in vegetables using large-volume injection column liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. A* **2000**, *892*, 379-390.
- [9] Pozo, O.J.; Martín, J.M.; Sancho, J.V.; Hernández, F. Direct determination of abamectin and azadiractin residues in orange samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2003**, *992*, 133-140.
- [10] Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chvez-Eng, C.M. Matrix effect in quantitative LC/MS/MS Analyses of Biological Fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 882-889.
- [11] Sancho, J.V.; Pozo, O. J.; López, F.J.; Hernández, F. Different quantitation approaches for xenobiotics in human urine samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. in Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 639-645.
- [12] Startin, J.R.; Sykes, M.D.; Taylor, J.C.; Hird, S.J.; Jackson, K.; Fussell, R.J; Hill, A.R.C. Determination of Residues of Pirimicarb and Its Desmethyl and Desmethylformamido Metabolites in Fruits and Vegetables by Liquid Chromatography-Electrospray/Mass Spectrometry. *J. AOAC Int.* **2000**, *83* (3), 735-741.

- [13] Mol, H.G.J.; van Dam, R.C.J.; Vreeken, R.J.; Steijger, O.M., Determination of daminozide in apples and apple leaves by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr. A* **1999**, 833, 53-60.
- [14] Taylor, M.J.; Hunter, K.; Hunter, K.B.; Lindsay, D.; Le Bouhellec, S. Multi-residue method for rapid screening confirmation of pesticides in crude extracts of fruits and vegetables using isocratic liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. A* **2002**, 982, 225-236.

6

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Se ha evaluado y aplicado un procedimiento de extracción con amplio rango de aplicación que podrá ser utilizado en trabajos futuros para métodos multiresiduos en la determinación de plaguicidas de diferentes polaridades. El método de extracción consiste en la utilización de la mezcla de disolventes, acetona, diclorometano-éter de petróleo (1:1) y acetato de etilo.
- Se ha optimizado un procedimiento de purificación de los extractos vegetales obtenidos, basado en la extracción en fase sólida usando cartuchos de fase diol, para ser utilizado en la determinación de carbendazima, tiabendazol, o-fenilfenol y bitertanol mediante LC-FD/DAD. Por otra parte, se ha llevado a cabo la evaluación de la purificación por SPE de los extractos vegetales en cartuchos de diol, sílica y Florisil para la determinación de o-fenilfenol, dicloran, clorotalonil, tiabendazol imazalil, propiconazol y bitertanol mediante GC-MS.
- Se ha desarrollado un método multiresiduo, basado en LC y detección por FD para la determinación de carbendazima, tiabendazol, o-fenilfenol y bitertanol en muestras de naranjas y bananas. El método se basa en la aplicación del procedimiento de extracción antes mencionado, y se complementa con la purificación de los extractos vegetales mediante extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos de fase normal tipo diol. El método permite la recuperación satisfactoria de carbendazima, tiabendazol y bitertanol (entre 70-117%) en naranjas y bananas, con límites de detección entre 0.01-0.6 mg·Kg⁻¹, asegurando la cuantificación correcta de los compuestos a niveles por debajo de los LMR establecidos.
- La mayor selectividad que presenta la detección por fluorescencia permite obtener cromatogramas más limpios que con detección por DAD. El uso complementario de ambos detectores hace posible la cuantificación de los analitos por FD, y la confirmación de la identidad de los analitos en muestras reales mediante comparación de los espectros obtenidos por DAD.

- Se ha desarrollado un método multiresiduo mediante GC y detección por MS para la determinación de o-fenilfenol, dicloran, clorotalonil, tiabendazol, imazalil, propiconazol y bitertanol en muestras de naranjas y bananas. El método se basa en la aplicación del procedimiento de extracción antes comentado, y se complementa con la purificación de los extractos vegetales mediante extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos de Florisil. El método desarrollado permite la recuperación satisfactoria (70-110%) de tiabendazol, imazalil, propiconazol y bitertanol, aunque se observan algunas pérdidas para dicloran y clorotalonil. En todos los casos, las desviaciones estándar fueron inferiores al 14% en naranjas, y al 8% en bananas. Los límites de detección obtenidos son inferiores a los LMR establecidos por la legislación, para todos los compuestos, a excepción del dicloran en bananas.
- El o-fenilfenol ha demostrado ser el analito más problemático en los procedimientos multiresiduos desarrollados por LC-FD y GC-MS, debido a las pérdidas parciales del compuesto durante la concentración del extracto y en la etapa de purificación. En sentido estricto, el método LC-FD desarrollado no podría ser usado para la determinación cuantitativa de este fungicida al ser las recuperaciones inferiores al 50%. Sin embargo, la aceptable precisión del método, principalmente en muestras de naranja, y su alta sensibilidad permitirían su aplicación con fines semi-cuantitativos de modo aceptable incluso para bajos niveles de residuos. Similar situación se ha presentado en la aplicación del método GC-MS, especialmente en bananas.
- Atendiendo a la necesidad de mejorar los valores de recuperación de o-fenilfenol obtenidos mediante los métodos multiresiduos antes descritos, se ha demostrado el potencial de la cromatografía líquida con columnas acopladas (LC-LC) para su eficiente determinación en muestras de naranjas y bananas. El uso de dos columnas C₁₈ acopladas permitió la automatización de la purificación de los extractos evitando pasos adicionales en el procedimiento analítico, reduciendo así la manipulación de la muestra.
- Se ha desarrollado un procedimiento analítico rápido, sensible y selectivo para la determinación de residuos de o-fenilfenol en naranjas mediante

LC-LC y detección por FD. El método se basó en una simple etapa de extracción del analito, como único tratamiento de la muestra, previo a la inyección directa del extracto en el sistema cromatográfico, obteniéndose recuperaciones entre 83-95% y un límite de detección de 0.01 mg·Kg⁻¹.

- El método LC-LC/FD desarrollado se ha ampliado a la determinación conjunta de residuos de o-fenilfenol y bitertanol en bananas. El procedimiento resultó igualmente rápido, selectivo y de elevada sensibilidad con un tiempo de análisis de 12 minutos y con un límite de detección del orden de 0.01 mg·Kg⁻¹ para los dos compuestos.
- Se ha desarrollado un método de análisis para la determinación de residuos de tridemorf en bananas y naranjas, basado en LC-MS/MS. De acuerdo con la consulta bibliográfica, éste es el primer método propuesto para su determinación, lo cual resulta de gran interés desde la necesidad de controlar sus residuos en el banano de Ecuador. El método también permite la determinación de otros fungicidas seleccionados (carbendazima, tiabendazol, imazalil, propiconazol y bitertanol) en estas muestras, de forma rápida, selectiva y sensible sin aplicación de etapas de purificación y mediante la inyección directa en el sistema cromatográfico del extracto de muestra diluido 5 veces. Las recuperaciones de tridemorf fueron del 83-99%, y para los demás fungicidas entre 75-106%, con valores de LOD para todos los compuestos entre 0.005-0.01 mg·Kg⁻¹.
- Se ha desarrollado un método para la determinación rápida de residuos de paclobutrazol en peras mediante LC-MS/MS (ES). La alta selectividad y sensibilidad del sistema LC-MS/MS permite la inyección directa del extracto vegetal obtenido mediante extracción con metanol, y permite la detección del analito a un nivel (0.7 µg·Kg⁻¹) 80 veces más bajo que el LMR establecido por la legislación europea. El tiempo de análisis cromatográfico es de tan sólo 5.5 minutos, posibilitando la determinación analítica de numerosas muestras por día.
- El uso de dos transiciones MS/MS, una para cuantificación y otra para confirmación, proporciona una elevada selectividad y cumple con los criterios de calidad (*identification points*) establecidos por la Unión

Europea para confirmación de la identidad de los compuestos detectados. Ello permite que los métodos LC-MS/MS desarrollados puedan ser usados con fines de confirmación, minimizando las posibilidades de reportar falsos positivos.

- Los dos métodos multiresiduos desarrollados en esta Tesis (uno basado en LC-FD y otro en GC-MS) junto con el método selectivo LC-LC/FD desarrollado para o-fenilfenol y bitertanol, se aplicaron a muestras de naranja y bananas de diferente procedencia geográfica. También se aplicó el método multiresiduo LC-MS/MS desarrollado para tridemorf y otros fungicidas, tanto con fines cuantitativos como de confirmación. En la mayoría de las trece muestras de naranja analizadas se encontraron tiabendazol, imazalil y o-fenilfenol. Solamente en dos de ellas se detectó carbendazima, cuando el análisis se realizó por el método más sensible LC-MS/MS. De todas las muestras analizadas, únicamente, en una de ellas se superaron los LMR establecidos por la legislación europea tanto para tiabendazol como para imazalil ($5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$). Por su parte, en tres de las nueve muestras de banana analizadas se detectó tiabendazol, imazalil y bitertanol. El tridemorf fue detectado en una sola muestra de banana mediante LC-MS/MS. En el caso de bitertanol, los valores encontrados en las tres muestras exceden el LMR establecido para este compuesto en bananas ($0.05 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$), mientras que tiabendazol e imazalil se encontraron siempre por debajo del LMR.
- Los resultados comparados obtenidos desde el punto de vista cualitativo son coherentes en cuanto a los positivos detectados y, únicamente, parece ser la sensibilidad el factor limitante, ya que los métodos menos sensibles no llegaron a detectar algunos de los analitos. Los resultados cuantitativos obtenidos fueron también coherentes para todos los métodos aplicados.
- Los positivos encontrados en las muestras reales analizadas por los métodos multiresiduos LC-FD y GC-MS, así como por LC-LC/FD, fueron confirmados mediante las técnicas más sensibles y selectivas de LC-MS/MS y GC-MS/MS.

- Se ha demostrado la aplicabilidad de los métodos desarrollados en muestras de naranjas y bananas, confirmándose la idoneidad de los métodos multiresiduos para fines de control (*monitoring*). Para la determinación selectiva de o-fenilfenol se recomienda la aplicación del método LC-LC/FD, más rápido, sensible y selectivo que los multiresiduos. Finalmente, la poderosa técnica LC-MS/MS ha permitido determinar tridemorf y otros fungicidas y, así como confirmar los resultados obtenidos con los métodos más convencionales descartando la existencia de falsos positivos.