



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

**DESARROLLO DE UN MÉTODO
CROMATOGRÁFICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE
CONTAMINANTES ORGÁNICOS
EN PRODUCTOS AVÍCOLAS**

Alumno/a: Caño Carrillo, Irene

Tutor/a: Prof. D. Juan Francisco García Reyes

Tutor/a: Prof. Dña. Bienvenida Gilbert López

Dpto: Química Física y Analítica

Julio, 2021



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Máster en Avances en Seguridad de los Alimentos

DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN PRODUCTOS AVÍCOLAS

Trabajo Fin de Máster presentado por:
Irene Caño Carrillo
Jaén, Julio de 2021

Fdo. Irene Caño Carrillo

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. OBJETIVOS	3
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1. Importancia del sector avícola de puesta y de carne.....	4
3.2. Seguridad alimentaria.....	6
3.3. Contaminantes alimentarios	8
3.3.1. <i>Clasificación de pesticidas</i>	<i>9</i>
3.3.2. <i>Clasificación de productos veterinarios</i>	<i>10</i>
3.4. Normativas sobre residuos de contaminantes en alimentos: límite máximo de residuos.....	12
3.5. Antecedentes.....	16
3.5.1. <i>Tratamiento de muestra</i>	<i>19</i>
3.5.2. <i>Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas</i>	<i>23</i>
4. EXPERIMENTAL	27
4.1. Materiales y reactivos	27
4.2. Tratamiento de muestra.....	28
4.3. Instrumentación	29
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
5.1. Desarrollo del método HPLC-TOFMS	31
5.2. Parámetros analíticos	35
5.3. Estudio de recuperación	42
5.4. Aplicación del método a muestras reales	44
6. CONCLUSIONES.....	46
7. BIBLIOGRAFÍA.....	47
8. ANEXOS	56
8.1. Abreviaturas	56

1. RESUMEN

En este trabajo se ha desarrollado un método para el análisis de residuos de pesticidas y productos veterinarios en productos avícolas, tales como huevo y carne de pollo. El método propuesto consta de una etapa de tratamiento de muestra basada en el empleo del método QuEChERS, haciendo uso de cartuchos EMR-Lipid como fase de *clean-up*. La detección y cuantificación de los analitos se basa en la aplicación de la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con un analizador de tiempo de vuelo (LC-TOFMS), empleando una fuente de ionización de electrospray (ESI) operando en modo positivo y negativo. El método se aplicó a la determinación de 48 pesticidas y productos veterinarios, incluyendo varios de diferentes familias, lográndose su separación en 10 minutos en las condiciones cromatográficas optimizadas. La identificación de cada uno de los compuestos a analizar se llevó a cabo a partir de la medida de masa exacta de la molécula protonada ($[M+H]^+$) o desprotonada ($[M-H]^-$) y el tiempo de retención, además de la información proporcionada por sus fragmentos y perfiles isotópicos. Los resultados obtenidos mostraron una buena linealidad para cada analito, siendo la mayoría de los coeficientes de regresión calculados superiores a 0.9900. Un estudio de recuperación fue llevado a cabo, obteniéndose recuperaciones superiores al 70% para la mayor parte de los compuestos analizados tanto en huevo como en carne de pollo. Todos los límites de cuantificación obtenidos se encontraban por debajo de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Finalmente, el método desarrollado fue aplicado al análisis de 6 muestras de huevo y carne de pollo de diferentes marcas comerciales, detectándose la presencia de varios de los analitos estudiados.

ABSTRACT

In this work, a method for the analysis of pesticide residues and veterinary products in poultry products, such as eggs and chicken meat, has been carried out. The proposed method consists of a sample treatment based on the use of the QuEChERS method, using EMR-Lipid cartridges as clean-up. The detection and quantification is based on the application of liquid chromatography coupled to mass spectrometry with a time-of-flight analyser (LC-TOFMS), using an electrospray ionisation (ESI) source operating in positive and negative ion mode. The method was applied for the determination of 48 pesticides and veterinary products from different classes, and the separation was achieved within 10 minutes under the optimised chromatographic conditions. The identification of each analyte was carried out from the exact mass measurement of the protonated ($[M+H]^+$) or deprotonated ($[M-H]^-$) molecule and the retention time, in addition to the information provided by their fragments and isotopic pattern. Appropriate results were obtained in terms of linearity, with most of the calculated regression coefficients better than 0.990. A recovery study was carried out, obtaining recoveries above 70% for most of the compounds analysed in both egg and chicken meat. All quantification limits obtained were below $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Finally, the developed method was applied to the analysis of 6 egg and chicken meat samples of different commercial brands, being identified several of the analytes studied.

2. OBJETIVOS

Los principales objetivos de este Trabajo Fin de Máster son los siguientes:

- Desarrollar y poner a punto un método para el análisis de pesticidas y productos veterinarios en huevo y en carne de pollo mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.
- Evaluar la eficacia del método propuesto mediante el estudio de diferentes parámetros de validación tales como la linealidad, límite de cuantificación, efecto matriz, así como la realización de un estudio de recuperación.
- Evaluar la aplicabilidad del método desarrollado para el estudio de pesticidas y productos veterinarios en muestras reales de huevo y carne de pollo.

3. INTRODUCCIÓN

La seguridad alimentaria es uno de los principales desafíos a nivel mundial. La necesidad de poner fin a este conflicto global es evidente y así queda recogido por la Organización de las Naciones Unidas (ONU), siendo la seguridad alimentaria uno de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) para su agenda 2030 (ONU, 2015). En concreto, en el segundo de estos ODS se establece la necesidad de erradicar todas las formas de hambre y desnutrición para el año 2030, siendo crucial el aumento de la productividad y sostenibilidad de las prácticas agrícolas para alcanzar este objetivo. Con el propósito de responder a la creciente demanda de alimentos es frecuente el empleo de productos fitosanitarios y medicamentos de uso veterinario. Además de estas sustancias también es posible encontrar otra gran cantidad de agentes tóxicos en los alimentos (Silano & Silano, 2015), lo cual hace que sea necesario mantener la presencia de estos residuos por debajo de unos límites. Para ello existen diferentes regulaciones que, ante la creciente exigencia de los consumidores, han conducido a la fijación de unos límites cada vez más estrictos. Es por ello por lo que existe la necesidad de aplicar métodos analíticos capaces de responder a las altas exigencias normativas. Además, el empleo de sustancias químicas no autorizadas y la incorporación de nuevos productos en el mercado hacen que sea imprescindible una mejora y una actualización continua de las metodologías analíticas destinadas al control de contaminantes en alimentos.

3.1. Importancia del sector avícola de puesta y de carne

Los huevos y la carne de pollo se encuentran entre los alimentos de origen animal más consumidos a nivel mundial. Ambos alimentos contribuyen a la nutrición humana gracias a su elevado contenido en proteínas de alta calidad y a su bajo nivel de grasas. El consumo de huevos y de carne de pollo ha aumentado rápidamente en los últimos años como consecuencia del incremento demográfico y la mayor demanda de alimentos, siendo un factor importante a tener en cuenta el bajo coste de producción de estos alimentos (FAO, 2020). Son estos motivos por los que se han elegido el huevo y la carne de pollo como alimentos en los que centrar el estudio propuesto.

El huevo es uno de los alimentos básicos en la dieta humana, siendo ampliamente utilizado debido a su importancia a nivel nutricional, económico y tecnológico. A partir del contenido del huevo es posible el origen de un nuevo ser vivo, lo cual justifica que éste sea uno de los alimentos más completos que existen. En el huevo es posible identificar tres partes diferentes como son la clara y la yema, que representan alrededor del 60% y 30% respectivamente, y la cáscara, la cual representa en torno al 10% del peso (Instituto de Estudios del Huevo, 2020). En lo referente a la composición, en un huevo entero y crudo es posible encontrar agua, proteínas, lípidos, carbohidratos y cenizas, los cuales representan en torno al 76.1%, 12.6%, 9.5%, 0.7% y 1.1%, respectivamente (Réhault-Godbert *et al.*, 2019).

Según los datos aportados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) para el año 2019, el sector del huevo de consumo en España supuso un 4% de la facturación dentro de la actividad ganadera y un 1,6% de la actividad agrícola. En lo que respecta a los sistemas de producción el 77% de las gallinas ponedoras fueron criadas en jaula, 13% en suelo, 9% camperas y 1% ecológicas. El consumo de huevos fue de 14,9 kg/*per cápita* en el año 2019, lo cual equivaldría a unos 237 huevos por persona y año. En el ámbito de la Unión Europea, España ocupa una posición destacada dentro de este sector productivo, siendo el cuarto productor comunitario tras Alemania, Polonia y Francia (MAPA, 2020). En cuanto a las exportaciones de huevos, España también juega un papel importante en la

distribución de este producto sobre todo a países de la Unión Europea, tal y como se muestra en el gráfico representado en la Figura 1.



Figura 1. Evolución de las exportaciones de huevos de consumo en España entre 2008 y 2019, en miles de toneladas (MAPA, 2020).

Por su parte, la carne de pollo es una de las carnes más solicitadas en todo el mundo. Algunas de las razones por las que el consumo de esta carne está tan extendido son su amplia disponibilidad, su bajo coste económico, así como su importante valor nutricional, siendo una fuente importante de vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales. En cuanto a su composición nutricional, el componente mayoritario de la carne de pollo es el agua, representando alrededor del 70% del peso total, seguida de las proteínas y lípidos, los cuales suponen aproximadamente un 20% y 10% del total, respectivamente (Moreiras *et al.*, 2018). Otro punto importante es que la carne de pollo no contiene grasas trans (relacionadas con la aparición de enfermedades coronarias) por lo que es considerada como una carne saludable, a diferencia de la carne de vacuno o de cordero que contienen grandes cantidades (FAO, 2013).

En el año 2019 en España, el consumo medio de carne de pollo fue de 12,37 kg/*per cápita*, manteniendo desde el año 2012 una tendencia descendente el consumo de este tipo de carne. Sin embargo, a pesar de este descenso, el año 2019 se caracterizó por el aumento de la producción de la carne de pollo, siendo España uno de los principales productores en el ámbito europeo. En cuanto al comercio exterior,

en este año también se produjo una ligera bajada de las importaciones y exportaciones de este tipo de carne, siendo los principales destinos países de la Unión Europea (MAPA, 2020).

Queda reflejado por tanto cómo la industria avícola es uno de los sectores más importantes desde el punto de vista de la producción de alimentos, siendo además un importante motor consolidado en la economía nacional. Es por la relevancia de este sector por lo que surge la necesidad de establecer sistemas de control eficaces para estos productos que garanticen en todo momento la seguridad del consumidor.

3.2. Seguridad alimentaria

El concepto de seguridad alimentaria ha ido modificándose a lo largo del tiempo desde su aparición a mediados de los años 70 (CSA, 2012). Después de toda su evolución se ha llegado a un concepto actual donde es posible diferenciar un sentido más amplio de seguridad alimentaria, así como un concepto más restringido. En un sentido más amplio se hace referencia a la definición adoptada por la Cumbre Mundial sobre la Alimentación (CMA) de 1996 donde se establece que *“existe seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias en cuanto a los alimentos a fin de llevar una vida activa y sana”* (FAO, 1996). En relación con esta definición se fijan los cuatro pilares fundamentales en los que se sustenta la seguridad alimentaria y que son la disponibilidad, el acceso, la utilización y la estabilidad (CSA, 2017).

Un aspecto clave a tener en cuenta en relación con la seguridad alimentaria es el crecimiento exponencial de la población en las últimas décadas, lo cual tiene como consecuencia una mayor demanda de alimentos. Una representación gráfica de este incremento queda reflejada en la Figura 2. Se estima que en el año 2050 habrá 9.7 billones de personas en el mundo, lo cual aumentaría en un 70% la necesidad de alimentos disponibles en relación con los que se consumen hoy en día (Cole *et al.*, 2018).

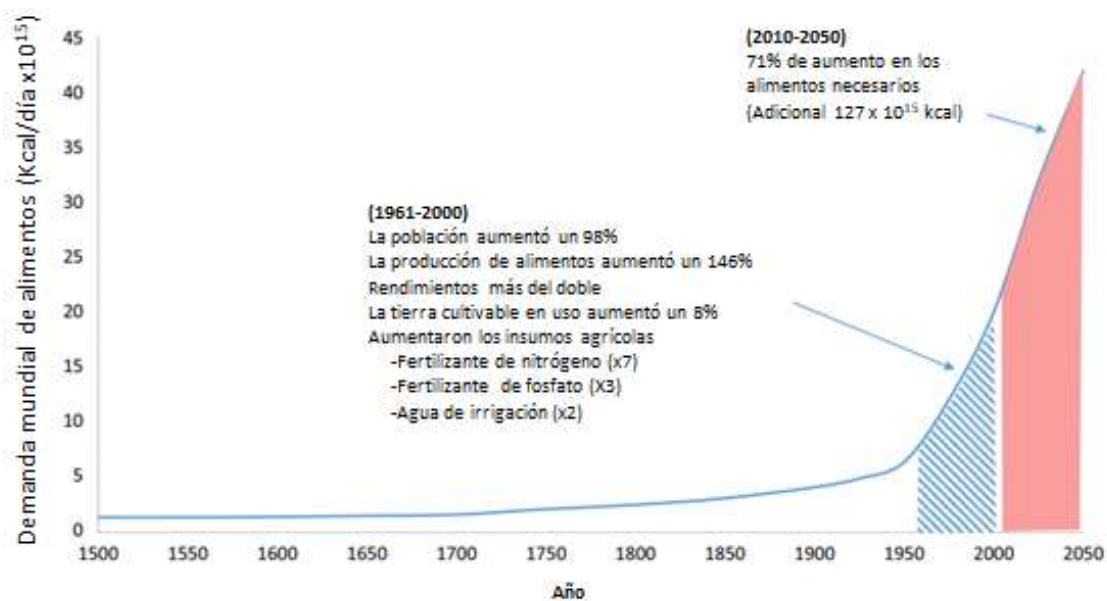


Figura 2. Demanda global de alimentos en los últimos años (Adaptada de Cole et al., 2018).

En vista de lo expuesto anteriormente, se pone de manifiesto la necesidad de aumentar la productividad de alimentos a nivel global. Dentro del sector agrícola y ganadero, el incremento de los rendimientos de producción está relacionado con el empleo de determinados insumos agrícolas tales como fertilizantes, agroquímicos, pesticidas, productos veterinarios, etc., algunos de los cuales están destinados al mantenimiento de las cosechas mediante el control de plagas, así como a la prevención y al tratamiento de enfermedades en explotaciones ganaderas (OCDE/FAO, 2019).

El empleo de estos productos permite conectar con ese concepto más restringido de seguridad alimentaria comentado anteriormente, el cual se centra en la calidad e inocuidad de los alimentos que llegan al consumidor. Con objeto de garantizar esta seguridad existen diferentes regulaciones que tienen como finalidad mantener la presencia de estos contaminantes por debajo de unos límites, asegurando en todo momento la salud del consumidor. Para ello es fundamental la actividad llevada a cabo por diferentes organizaciones donde, en función del ámbito de actuación, es posible identificar tres niveles de organización.

En el ámbito internacional se encuentra el conocido como “*Codex Alimentarius*”, el cual surge a partir de un programa conjunto creado por la Organización Mundial de

la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Este programa tiene como principal objetivo la unificación y armonización de criterios, permitiendo de esta manera un comercio internacional de alimentos inocuos. En un contexto europeo, el órgano científico de referencia es la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la cual tiene como finalidad el mantenimiento de la seguridad de los alimentos en los estados miembros de la Unión Europea garantizando el correcto funcionamiento del mercado interior. A nivel estatal, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) tiene como función actuar como punto nacional de contacto con las diferentes redes de alerta encargadas de gestionar los riesgos alimentarios, como son el Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información (SCIRI) a nivel nacional, la Red de Alerta alimentaria de la Unión Europea (RASFF), así como la Red de alerta de la OMS y la FAO (INFOSAN).

3.3. Contaminantes alimentarios

El riesgo de contaminación en la cadena alimentaria agrícola es muy amplio ya que son múltiples las fuentes que pueden dar origen a esa contaminación (Silano & Silano, 2015). Es esta extensa variedad de contaminantes la que hace que sea fundamental mantener su presencia en los alimentos por debajo de unos límites, siendo las sustancias químicas, tales como productos fitosanitarios, metales, aditivos alimentarios, contaminantes orgánicos, etc., una de las mayores preocupaciones para los consumidores (Etienne *et al.*, 2018).

Dentro de la industria avícola se va a centrar la atención en la contaminación causada por pesticidas y productos veterinarios, ya que son éstos algunos de los agroquímicos más frecuentemente encontrados en los productos derivados de este sector (Filazi *et al.*, 2017). Estas sustancias pueden introducirse en la cadena de producción debido a los residuos presentes en piensos o en agua utilizados para la alimentación, así como consecuencia de una exposición directa en el curso de control de plagas o tratamiento de enfermedades (Aulakh *et al.*, 2006). Es por ello por lo que se va a realizar una clasificación más detallada de pesticidas y productos veterinarios.

3.3.1. Clasificación de pesticidas

Cuando se habla de pesticida se hace referencia a “cualquier sustancia o mezcla de sustancias de composición química o biológica destinada a repeler, destruir o controlar cualquiera plaga o regular el crecimiento de las plantas” (FAO & WHO, 2014). Dentro de este concepto se incluyen una gran variedad de pesticidas con diferentes propiedades físicas y químicas, siendo posible establecer varias clasificaciones de estas sustancias en función de distintos aspectos.

Una clasificación se establece en función de su composición química y la descripción de sus ingredientes activos (Hassaan & El Nerm, 2020). De esta manera es posible clasificar a los pesticidas en cuatro categorías principales: organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides. Otra forma de clasificar estas sustancias es la basada en la función del pesticida y el tipo de plaga sobre el que actúan (Yadav & Devi, 2017). Una clasificación general de los pesticidas se muestra en la Figura 3.

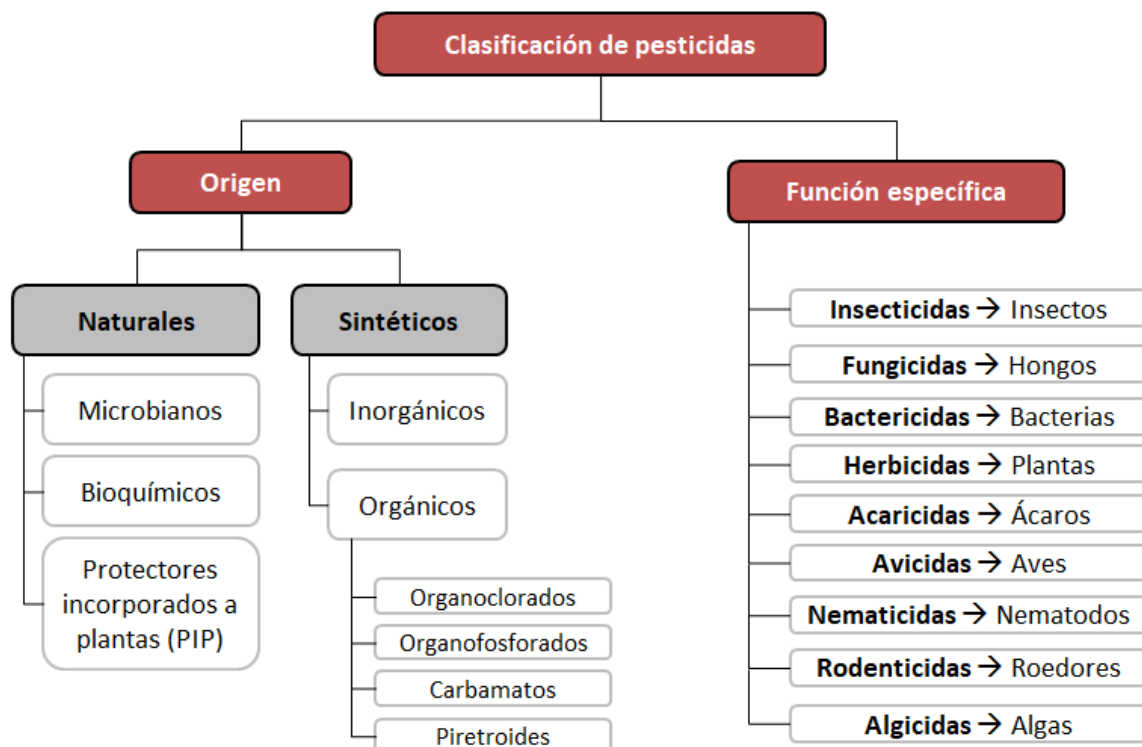


Figura 3. Clasificación general de pesticidas (Adaptada de Yadav & Devi, 2017).

Un aspecto clave a tener en cuenta cuando se hace uso de pesticidas es la toxicidad que presenta cada uno de ellos. En este sentido se recurre a la “*Clasificación recomendada por la OMS para los plaguicidas según su peligrosidad*” (OMS, 2010), recogida en la Tabla 1 del texto, la cual clasifica a los pesticidas según su toxicidad aguda dérmica y oral utilizando la dosis letal media estimada (LD_{50}). Este parámetro estadístico hace referencia a la dosis de pesticida que resulta letal para la mitad de los animales probados (ratas) cuando ingresan en el cuerpo por vía oral o dérmica.

Tabla 1. Clasificación de pesticidas recomendada por la OMS (OMS., 2010).

Clase OMS	LD ₅₀ para rata (mg kg ⁻¹ de peso corporal)	
	Oral	Dérmica
Ia. Extremadamente peligrosos	<5	<50
Ib. Altamente peligrosos	5-50	50-200
II. Moderadamente peligrosos	50-2000	200-2000
III. Ligeramente peligrosos	>2000	>2000
U. Poco probable de presentar riesgo agudo	≥5000	≥5000

Esta clasificación de la OMS se ha puesto en consonancia con las categorías de peligro de toxicidad aguda del Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA), si bien los criterios de clasificación no son idénticos a los fijados por la OMS, ya que ésta última hace referencia mayoritariamente a los riesgos derivados de las propiedades intrínsecas de los pesticidas.

3.3.2. Clasificación de productos veterinarios

Se define un medicamento veterinario como “*toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales*”, de acuerdo con lo establecido en la Directiva 2001/82/CE. Una clasificación importante de estas sustancias es la establecida en función de su campo de aplicación (Frenich *et al.*, 2009), pudiéndose diferenciar varias familias de compuestos tal y como se muestra en la Figura 4.

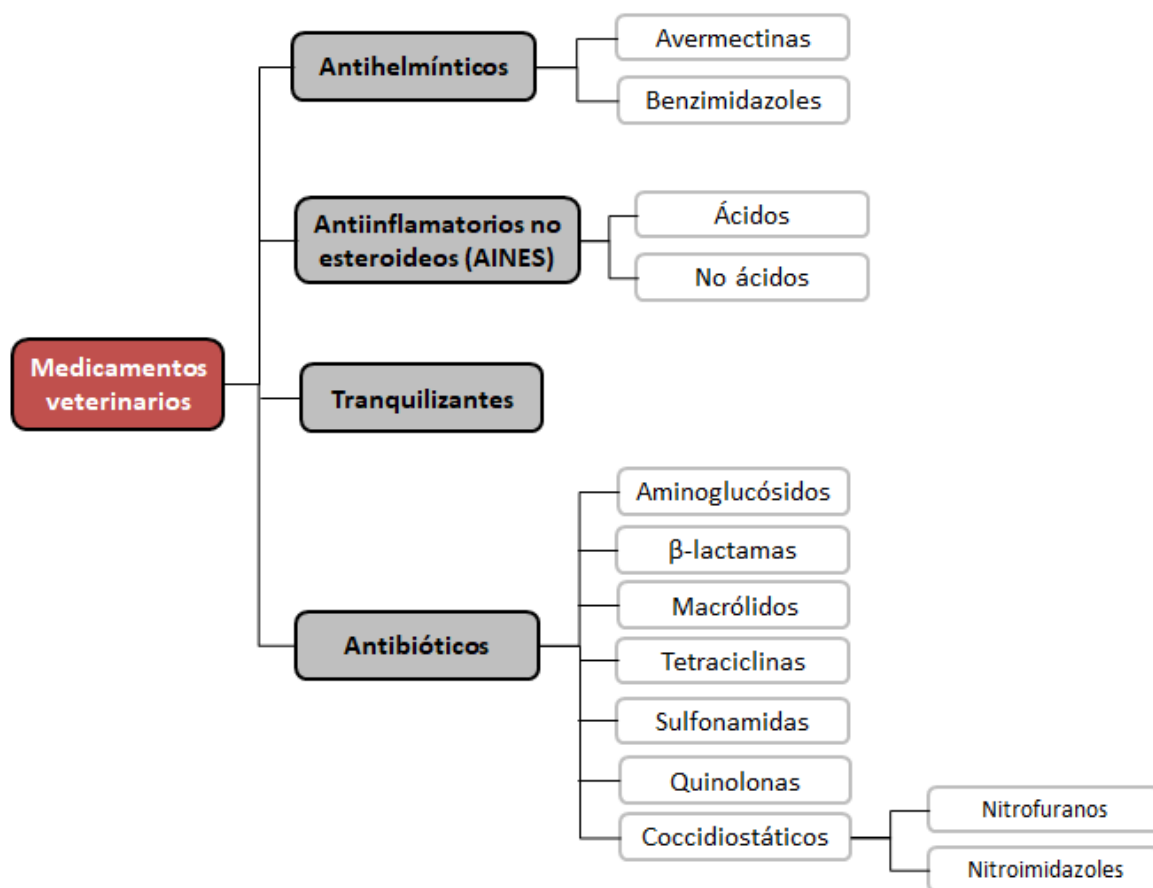


Figura 4. Familias de medicamentos veterinarios según su campo de aplicación (Adaptada de Frenich et al., 2009).

Otra clasificación para productos veterinarios queda recogida en la Directiva 96/23/CE, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos. Esta Directiva divide los residuos contenidos en ella en dos grupos diferenciados, como son el grupo A y grupo B. Dentro del grupo A se incluyen las sustancias que presentan efectos anabolizantes y aquellas cuyo uso no está autorizado en animales destinados a la producción de alimentos. Por su parte, aquellas sustancias que sí están permitidas para ser utilizadas como medicamentos veterinarios se encuentran dentro del grupo B. Una clasificación detallada de estas sustancias se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de productos veterinarios según Directiva 96/23/CE. Grupo A: Sustancias con efecto anabolizante y sustancias no autorizadas. Grupo B: Medicamentos veterinarios y contaminantes.

GRUPO A	I. Estilbenos, derivados de los estilbenos, sus sales y ésteres II. Agentes antitiroideos III. Esteroides IV. Lactonas de ácido resorcílico (incluido Zeranol) V. β-agonistas VI. Sustancias incluidas en el anexo IV del Reglamento (CEE) N° 2377/90
GRUPO B	I. Sustancias antibacterianas, incluidas las sulfamidas y las quinolonas II. Otros medicamentos veterinarios: a. Antihelmínticos b. Anticoccidianos, incluidos los nitroimidazoles c. Carbamatos y piretroides d. Tranquilizantes e. Antiinflamatorios no esteroideos (AINES) f. Otras sustancias que ejerzan una actividad farmacológica III. Otras sustancias y contaminantes medioambientales a. Compuestos organoclorados, incluidos los PCB b. Compuestos organofosforados c. Elementos químicos d. Micotoxinas e. Colorantes f. Otros

Posteriormente a esta clasificación, y por razones de facilidad de uso, todas las sustancias farmacológicamente activas se enumeraron por orden alfabético de acuerdo con lo establecido en el Reglamento (UE) N° 37/2010, fijándose una clasificación general de las mismas que diferencia entre sustancias autorizadas y sustancias prohibidas en alimentos de origen animal.

3.4. Normativas sobre residuos de contaminantes en alimentos: límite máximo de residuos

Se define el Límite Máximo de Residuo (LMR) como *“la máxima concentración de residuos que puede ser legalmente permitida o reconocida como aceptable en alimentos, piensos o artículos agrícolas”* (FAO & WHO, 2014). La fijación de estos LMRs se basa en la aplicación de los principios de las buenas prácticas agrícolas (BPA), permitiendo de esta manera la obtención de alimentos toxicológicamente aceptables. Son varias las bases de datos existentes encargadas de recopilar los LMRs de las diferentes sustancias que pueden aparecer en los alimentos, siendo la principal fuente internacional de LMR el *Codex Alimentarius* (*Codex Alimentarius*,

FAO/OMS). Otros organismos que también cuentan con una base de datos de LMRs son la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (USFDA, *United States Food and Drug Administration*), así como la Unión Europea (*EU Pesticides Database*). Algunas de las normativas europeas relacionadas con la fijación de los LMRs para residuos de pesticidas y productos veterinarios en alimentos, así como de otros contaminantes, queda resumida en la Tabla 3.

Tabla 3. Legislación europea aplicable a residuos de contaminantes en alimentos.

Sustancia activa	Normativa	Descripción
Pesticidas	Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo	Relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal.
Productos veterinarios	Reglamento (CE) N° 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo	Relativo a los procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal.
	Reglamento (UE) N° 37/2010 de la Comisión	Relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal.
Otros contaminantes	Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión	Relativo a la fijación del contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

Sin embargo, a pesar de la existencia de organismos internacionales, como el *Codex*, que tratan de armonizar la aplicación de los LMRs, es posible encontrar diferencias en estos valores en función de la normativa adoptada. Para observar estas discrepancias se va a presentar en la Tabla 4 una recopilación de los analitos que van a ser analizados en este trabajo, mostrando una comparación de sus LMRs fijados por el *Codex*, la Unión Europea y la USFDA. La selección de estos compuestos se ha realizado teniendo en cuenta la bibliografía publicada previamente y según su frecuencia de aparición en el análisis de alimentos. Se incluyen un total de 48 analitos pertenecientes a diferentes categorías tanto de pesticidas (herbicidas, insecticidas, fungicidas, acaricidas, etc.) como de productos veterinarios (tetraciclinas, sulfonamidas, penicilinas, macrólidos, quinolonas, etc.).

Tabla 4. LMRs de los compuestos a analizar fijados por el Codex, UE y USFDA.

Compuesto ⁽¹⁾	Clase	LMR Codex ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		LMR UE ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		LMR USFDA ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
		Huevo	Pollo ⁽²⁾	Huevo	Pollo ⁽²⁾	Huevo	Pollo ⁽²⁾
Ampicillin	Fármaco			0	50		
Acephate	Pesticida	10			20*	100	100
Acetamiprid	Pesticida	10			20		
Aclonifen	Pesticida				10*		
Alachlor	Pesticida				10*	20	20
Amitrole	Pesticida				50*		
Carbofuran	Pesticida				10*		
Chloramphenicol	Fármaco						
Chlortetracycline	Fármaco			200	100		
Ciprofloxacin Chlorhydrate	Fármaco						
Cloxacillin	Fármaco			0	300		
Danofloxacin	Fármaco		200	0	200		
Diclazuril	Fármaco			0	500		
Difenoconazole	Pesticida	30				20	
Difloxacin	Fármaco			0	300		
Disulfoton	Pesticida	20			20		
Enrofloxacin	Fármaco			0	100		
Erythromycin	Fármaco	50	100	150	200		125
Fenbendazole	Fármaco			1300	50		
Fenthion	Pesticida				10*		
Fipronil	Pesticida	20	10	5	5	20	20
Fipronil sulfone	Pesticida						
Flumequine	Fármaco		500	0	400		
Fluralaner	Fármaco			1300	65		
Imidacloprid	Pesticida	200			50*	20	50
Levamisole	Fármaco			0	10		
Lincomycin	Fármaco		200	50	100		
Metconazole	Pesticida				20*	40	
Nicarbazin	Fármaco		200				
Paclobutrazol	Pesticida				10		
Piperonyl butoxide	Pesticida	1000				1000	3000
Robenidine	Fármaco						100
Sarafloxacin	Fármaco		10	0			
Spinosad	Pesticida	10			200	300	100
Spiramycin	Fármaco		200	0	200		

Tabla 4. LMRs de los compuestos a analizar fijados por el Codex, UE y USFDA (continuación).

Compuesto ⁽¹⁾	Clase	LMR Codex (µg kg ⁻¹)		LMR UE (µg kg ⁻¹)		LMR USFDA (µg kg ⁻¹)	
		Huevo	Pollo ⁽²⁾	Huevo	Pollo ⁽²⁾	Huevo	Pollo ⁽²⁾
Spirotetramat	Pesticida	10			10	20	20
Sulfadimethoxine	Pesticida			0	100		100
Sulfamethazine	Fármaco			0	100		100
Sulfamethizole	Fármaco			0	100		
Sulfanilamide	Fármaco			0	100		
Sulfapyridine	Fármaco			0	100		
Sulfaquinoxaline	Fármaco			0	100		100
Sulfathiazole	Fármaco			0	100		
Terbutylazine	Pesticida				50 [*]		
Thiabendazole	Pesticida	100			2000		
Thiamphenicol	Fármaco			0	500		
Tilmicosin	Fármaco		150	0	75		
Trimethoprim	Fármaco			0	50		

(*) Límite inferior de determinación analítica

(1) Nombres de compuestos en inglés

(2) LMRs en músculo de pollo

Tal y como puede observarse, el nivel de exigencia difiere en cada uno de los organismos reguladores. En comparación con los límites fijados por el Codex o la USFDA, la UE establece unos LMRs más estrictos, incluyendo además una amplia cantidad de sustancias. En un informe del Parlamento Europeo de 2018 se identificó el proceso europeo de fijación de LMRs como “uno de los más estrictos del mundo” y algunos representantes de la industria sugieren que el proceso es “más complejo que en cualquier otro lugar” (USITC, 2020). Esta divergencia entre las políticas de LMR en los distintos países pone de manifiesto la importancia de los LMRs ya que la fijación de estos límites va a tener consecuencias directas en el comercio internacional de los productos alimenticios. Es posible que los exportadores agrícolas no puedan vender sus cultivos a mercados en los que el LMR fijado sea menor que el de su mercado interno, particularmente si este límite es tan bajo que es difícil para los productores cumplir al tiempo que protegen sus cultivos de plagas y enfermedades nocivas.

3.5. Antecedentes

Para llevar a cabo el análisis de contaminantes orgánicos en alimentos es necesario el empleo de métodos analíticos sensibles, precisos, selectivos, capaces de permitir la identificación y cuantificación de un amplio número de compuestos en las diferentes matrices alimentarias. El procedimiento a seguir consta de una primera etapa de tratamiento de muestra para conseguir la extracción de los analitos, la cual puede ir acompañada de una fase de purificación o *clean-up*. En una segunda etapa el extracto obtenido es sometido a distintas técnicas de separación y detección de los analitos.

A continuación, se describen algunos de los tratamientos de preparación de muestra más frecuentemente empleados para el análisis de contaminantes orgánicos en alimentos recogidos en bibliografía, así como las técnicas de análisis más habituales basadas en la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas. La Tabla 5 muestra un resumen con algunos de los métodos más representativos que se han empleado para el análisis multiresiduo de pesticidas y productos veterinarios en huevo y en carne de pollo en los últimos años.

Tabla 5. Selección de métodos para el análisis de pesticidas y productos veterinarios en productos avícolas.

Nº analitos	Analitos	Muestra	Extracción	Purificación (<i>Clean up</i>)	Determinación	Ref.
59	Pesticidas	Huevos	QuEChERS H ₂ O + ACN (1% HAc) + MgSO ₄ + NaAc	d-SPE: PSA + C₁₈+ MgSO₄ Centrifugación: 5000 rpm (1min) Filtración en filtro PVDF 0,22µm Adición de formato de amonio en agua + ACN	LC-QQQMS/MS	(Akgün <i>et al.</i> , 2020)
140	Productos veterinarios	Carne de pollo	SLE Na ₂ EDTA + ACN:EtOH (80:20, v/v) Extracción con <i>n</i> -hexano (x2)	d-SPE: PSA + NH₂ Evaporación en corriente de N ₂ Reconstitución en DMSO:MeOH (25:75, v/v) Filtración en filtro PES 0,2 µm	UHPLC-QQQMS	(Cao <i>et al.</i> , 2018)
4	Productos veterinarios	Huevos	LLE ACN:H ₂ O (30:70 v/v) + Acetato de etilo: ACN:NH ₄ OH (49:49:2, v/v) (x2)	Clean-up con hexano Adición de hexano saturado con ACN puro y centrifugación (x2) Evaporación en corriente de N ₂ Reconstitución en ACN:H ₂ O (10:90 v/v) Filtración con filtro 0,22µm	LC-QQQMS/MS	(Xie <i>et al.</i> , 2018)
16	Productos veterinarios	Carne de pollo	QuEChERS ACN: Ác. Fórmico 0,1% + MgSO ₄ + NaAc	d-SPE: PSA + C₁₈+ MgSO₄ Centrifugación: 3000 rpm (5 min) Evaporación en corriente de N ₂ Reconstitución en ACN:H ₂ O (10:90 v/v) Filtración con filtro de nylon 0,22µm	UPLC-Q-Orbitrap-MS	(Chen <i>et al.</i> , 2017)
4	Pesticidas	Huevos	QuEChERS H ₂ O + ACN + Na ₃ - citrato·2H ₂ O + Na ₂ H- citrato·1,5H ₂ O + NaCl	d-SPE: EMR-Lipid Centrifugación: 3500 rpm (5 min) Sobrenadante: Mg ₂ SO ₄ + NaCl (1:4 w/w) Centrifugación: 3500 rpm (5min) Dilución en agua	LC-QTOFMS	(Parrilla-Vázquez <i>et al.</i> , 2018)
105	Productos veterinarios	Huevos Leche Carne de cerdo, bovino	LLE Extracción 1: Na ₂ SO ₄ anhidro+ ACN: Ác. Fórmico 0,1% Extracción 2: ACN: Ác. Fórmico 0,1% Extracción 3: Acetato de etilo Evaporación a 40°C Reconstitución NH ₃ :MeOH (5:95, v/v)	SPE: Oasis HLB Preacondicionamiento: H ₂ O + NH ₃ :MeOH (5:95, v/v) Elución: NH ₃ :MeOH (5:95, v/v) Evaporación en corriente de N ₂ Reconstitución en H ₂ O:ACN (7:3 v/v)	UHPLC-TOFMS	(Deng <i>et al.</i> , 2011)

Tabla 5. Selección de métodos para el análisis de pesticidas y productos veterinarios en productos avícolas (continuación).

Nº analitos	Analitos	Muestra	Extracción	Purificación (<i>Clean up</i>)	Determinación	Ref.
120	Productos veterinarios	Huevos Leche Carne de pollo, cerdo, ovino, bovino	UAE ACN:H ₂ O (90:10, v/v)	SPE: Oasis HLB Preacondicionamiento MeOH:H ₂ O Elución Ác.Fórmico:MeOH (5:95, v/v) + AcEt Evaporación Reconstitución ACN:H ₂ O (5:95, v/v) Filtración en filtro de nylon 0,22µm	LC-QQQMS/MS	(Chen <i>et al.</i> , 2016)
58	Pesticidas	Huevos	QuEChERS H ₂ O + ACN (1% HAc) + NaCl	Filtro multifunción (MFF) Filtración directa a través de un MFF (PSA + C ₁₈ + MgSO ₄)	UHPLC-QQQMS/MS	(Zhang <i>et al.</i> , 2019)
4	Pesticidas	Carne de pollo Huevos	QuEChERS H ₂ O + ACN + NaCl	d-SPE: PSA + C₁₈ + MgSO₄ Centrifugación: 9000 rpm (5 min)	LC-QQQMS/MS	(Guo <i>et al.</i> , 2018)
169	Productos veterinarios	Huevos	LLE H ₂ O + ACN (5% HAc)	d-SPE: EMR-Lipid Activación EMR-Lipid: Acetato de amonio Adición de MgSO ₄ Evaporación en corriente de N ₂ Reconstitución en ACN:H ₂ O (15:80 v/v) Filtración con filtro 0,22µm	UHPLC-QQQMS/MS	(Luo <i>et al.</i> , 2019)
20	Productos veterinarios	Carne de pollo	QuEChERS H ₂ O + ACN:H ₂ O (30:70 v/v) (1% HAc) + Na ₃ - citrato·2H ₂ O + Na ₂ H-citrato·1,5H ₂ O + MgSO ₄ anhidro	d-SPE: PSA Centrifugación: 5000 rpm (5min) Filtración en filtro de nylon Dilución ACN:H ₂ O (50:50 v/v) (1% HAc)	UHPLC-QQQMS/MS	(Lopes <i>et al.</i> , 2012)
18	Pesticidas	Huevos	QuEChERS ACN (1% HAc) + MgSO ₄ + NaAc	d-SPE: PSA + C₁₈ + MgSO₄ + GCB Centrifugación: 4500 rpm (10min) Evaporación en corriente de N ₂ Reconstitución en ACN:H ₂ O (1:1 v/v) Filtración en filtro de nylon 0,2µm	LC-QQQMS/MS	(Choi <i>et al.</i> , 2015)

3.5.1. Tratamiento de muestra

La determinación de contaminantes en matrices complejas, como es el caso de los alimentos, requiere una amplia fase de extracción y preparación de las muestras antes de llevar a cabo el análisis instrumental. Esta etapa cobra especial importancia en el caso del análisis de trazas, donde la aplicación de técnicas de extracción suficientemente sensibles resulta fundamental para permitir el análisis a los bajos niveles de concentración de contaminantes exigidos por la legislación. La optimización de la preparación de la muestra es necesaria no solo por la reducción del tiempo de análisis, sino porque cada paso añadido es una posible fuente de error. El método de extracción seleccionado va a estar condicionado por la naturaleza de los compuestos a analizar y la matriz empleada, así como de la técnica utilizada para la detección y cuantificación. A continuación, se van a describir algunas de las técnicas de extracción más utilizadas para la determinación de pesticidas y medicamentos veterinarios.

- **Extracción con disolventes**

La extracción con disolventes es una de las técnicas tradicionales de preparación de muestra más comúnmente empleadas debido a su facilidad de uso y su amplio rango de aplicabilidad. Este procedimiento va a ser ligeramente diferente en función de que se aplique en muestras sólidas (extracción sólido-líquido, SLE) o en muestras líquidas (extracción líquido-líquido, LLE) (Lambropoulou & Albanis, 2007), siendo esta última especialmente utilizada para la extracción de analitos orgánicos en muestras acuosas. La técnica está basada en la distribución o reparto de los analitos entre las fases líquida y sólida (SLE) o entre dos fases líquidas inmiscibles (LLE) para las que el analito y la matriz tienen distintas solubilidades, consiguiéndose de esta manera la extracción de los analitos desde la matriz de la muestra hasta el disolvente empleado (Beyer & Biziuk, 2008). La eficiencia de la extracción va a depender de diferentes factores como son el disolvente utilizado, el pH del medio, la adición de sales, etc.

El disolvente más comúnmente utilizado para llevar a cabo la extracción es el acetonitrilo (MeCN) ya que permite una desnaturalización efectiva de las proteínas

de la muestra (Chiaochan *et al.*, 2010), siendo esto fundamental para evitar la formación de emulsiones y espumas en matrices con un alto contenido proteico, como es el caso del huevo (Frenich *et al.*, 2011). No obstante, en muestras con una menor proporción lipídica y proteica, como ocurre con la carne de pollo, también es posible obtener buenos resultados de extracción con el uso de otros disolventes como el metanol (Chico *et al.*, 2008). Otro aspecto importante a tener en cuenta es el pH del medio de extracción, siendo varios los autores que confirman la mayor eficacia de extracción gracias al empleo de ácidos tanto para el caso de pesticidas (Zhang *et al.*, 2019) como de productos veterinarios (Zhang *et al.*, 2018).

Sin embargo, a pesar de ser una de las técnicas de extracción clásicamente más utilizadas, también presenta algunas limitaciones importantes, siendo su principal desventaja el elevado consumo de disolventes orgánicos. Además, la falta de automatización, la formación de emulsiones y su limitada selectividad (especialmente en análisis a nivel de trazas) han hecho que la extracción con disolventes en la actualidad sea utilizada mayoritariamente como una etapa previa a la aplicación de otras técnicas de tratamiento de muestra.

- **Extracción en fase sólida (SPE)**

La extracción en fase sólida es una técnica ampliamente utilizada en muestras medioambientales y alimentarias, pudiendo ser utilizada para diferentes propósitos como el enriquecimiento de trazas, purificación, derivatización, entre otros (Lucci *et al.*, 2012). El procedimiento consiste en hacer pasar una muestra líquida por un cartucho que contiene un adsorbente sólido, consiguiendo de esta manera que los analitos queden retenidos en el cartucho y sean posteriormente eluidos con un disolvente adecuado. Normalmente este proceso, esquematizado en la Figura 5, se suele dividir en cuatro etapas: 1) acondicionamiento del cartucho, 2) carga de la muestra, 3) lavado con un disolvente que eluya a los interferentes, y 4) elución de los analitos con un disolvente apropiado (Ötles & Kartal., 2016).

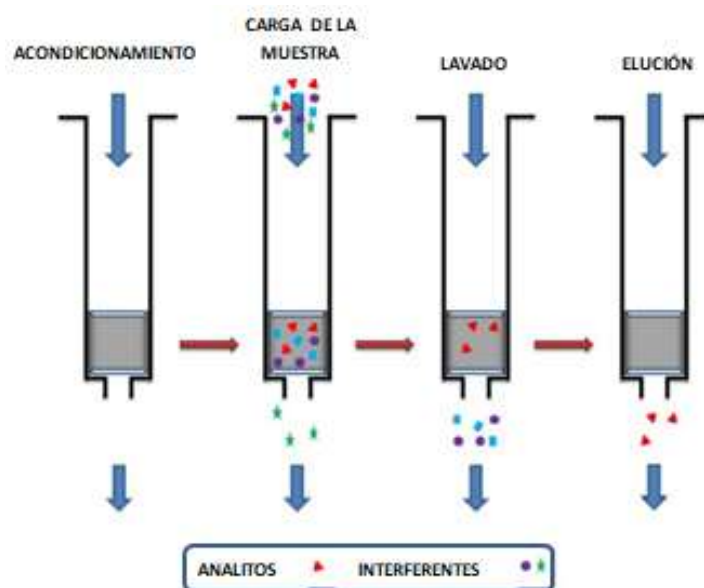


Figura 5. Procedimiento general de una SPE (Adaptada de Lucci *et al.*, 2012).

La selectividad del adsorbente empleado va a depender de las fuerzas de atracción entre los analitos y los grupos funcionales de la superficie del adsorbente. De esta manera, en función del tipo de fase sólida empleada, las interacciones entre los analitos y el adsorbente pueden ser a través de enlaces de hidrógeno, interacciones polares o apolares, de intercambio catiónico o aniónico, o por exclusión de tamaño (Ridgway *et al.*, 2007). Uno de los adsorbentes más frecuentemente empleados en los últimos años es el conocido como OASIS HLB (*Hydrophilic-Lipophilic-Balanced*), el cual es un adsorbente polimérico de fase reversa especialmente eficaz para el análisis de compuestos polares. Este tipo de adsorbente ha sido utilizado satisfactoriamente por diferentes autores tanto para el análisis de pesticidas (Liu *et al.*, 2010) como de productos veterinarios (Chen *et al.*, 2016) en huevo y carne de pollo.

Las ventajas de la SPE en comparación con la LLE (menor consumo de disolventes, mayor selectividad y reproducibilidad, posibilidad de automatización), han permitido que esta técnica haya sido muy empleada para el análisis de contaminantes en alimentos de diverso origen como pescado (Sagrati *et al.*, 2012), miel (Azzouz & Ballesteros, 2015), o aceite (Boulanouar *et al.*, 2018). Es por ello por lo que se ha consolidado como una de las técnicas más utilizadas para la preparación de la muestra, así como una etapa de purificación de los extractos obtenidos previamente mediante la aplicación de otras técnicas de extracción.

- **Extracción QuEChERS**

El método QuEChERS (acrónimo en inglés de “*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe*”) es una de las técnicas de extracción más importantes en la actualidad para el análisis de contaminantes orgánicos en alimentos. De manera general, este método consta de una primera etapa de extracción con disolventes seguida de una fase de purificación mediante una extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE), utilizando varias combinaciones de sorbentes porosos y sales para eliminar las sustancias que intervienen en la matriz (Perestrelo *et al.*, 2019).

Al igual que en otras técnicas de preparación de muestra, se debe llevar a cabo la optimización de determinados parámetros como la naturaleza del disolvente, el pH del medio, o la adición de sales, ya que van a influir en la eficacia de la extracción. Aunque inicialmente este procedimiento fue propuesto para el análisis de pesticidas en frutas y vegetales (Anastassiades *et al.*, 2003), diferentes versiones han sido desarrolladas posteriormente a fin de mejorar la extracción de los analitos: el método oficial AOAC (*Association of Official Analytical Collaboration*) basado en el empleo de un tampón acetato (Lehotay *et al.*, 2007), y el método CEN EN 15662 basado en empleo de un tampón citrato (*European committee for standardization.*, 2008).

En lo referente a la naturaleza del disolvente, algunos de los más comunes son el acetonitrilo, el acetato de etilo o la acetona, si bien existen numerosas referencias que demuestran la mayor eficacia de extracción con el uso de acetonitrilo, siendo éste por tanto el disolvente más frecuentemente empleado (González-Curbelo *et al.*, 2015; Perestrelo *et al.*, 2019). Con respecto al pH, se ha demostrado que el acetonitrilo acidificado mejora los resultados de extracción tanto en pesticidas (Lehotay *et al.*, 2010) como en productos veterinarios (Zhang *et al.*, 2015). Un punto importante en este método es la adición de sales para facilitar el paso de los analitos al disolvente orgánico de extracción (*salting-out*). En el método QuEChERS original las sales más frecuentemente utilizadas son el sulfato de magnesio (MgSO₄) y el cloruro de sodio (NaCl). Junto con la adición de estas sales también suele ser frecuente la utilización de agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), debido a la tendencia de algunos compuestos (como las tetraciclinas o macrólidos) a formar complejos de coordinación con los iones divalentes del medio

(Mg⁺², Ca⁺², Zn⁺², Cu⁺²) y que impedirían su recuperación en la fase orgánica (Cao *et al.*, 2018).

Como se ha comentado anteriormente, la segunda etapa del método consiste en llevar a cabo una extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE). Aquí va a jugar un papel fundamental el adsorbente sólido encargado de la purificación. Algunos de los más comúnmente empleados son la amina primaria-secundaria (PSA), las sílices de C₁₈ o el carbón grafitizado (GCB) (Choi *et al.*, 2015). Últimamente, el empleo de un nuevo adsorbente conocido como EMR-Lipid (*Enhanced Matrix Removal-Lipid*) está teniendo una gran aplicación, siendo especialmente útil para la eliminación de lípidos en matrices grasas (Parrilla-Vázquez *et al.*, 2018). Una comparación entre este nuevo adsorbente y otro de los más convencionales, como es el C₁₈, puso de manifiesto la mayor eficacia de extracción mediante el empleo de EMR-Lipid para el análisis de productos veterinarios en muestras de huevo (Luo *et al.*, 2019).

Las numerosas ventajas del método QuEChERS (recogidas en su acrónimo) han permitido que, en la actualidad, ésta sea una de las técnicas de extracción más utilizadas para el análisis de contaminantes orgánicos en alimentos. Es posible encontrar una gran cantidad de bibliografía que hace uso del método QuEChERS dentro de este campo (Perestrelo *et al.*, 2019). La relevancia de este método ha permitido su comparación con otras técnicas de extracción de referencia como LLE (Calatayud-Vernich *et al.*, 2016) o SPE (Negre *et al.*, 2014), obteniéndose mejores resultados con el uso del método QuEChERS.

3.5.2. Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas

Actualmente existe una gran sensibilidad en la opinión pública en todos los asuntos relacionados con la seguridad alimentaria, lo cual ha tenido como consecuencia la fijación de unos LMRs de cada vez más estrictos. Es por ello por lo que se impulsa la necesidad de emplear metodologías de análisis lo suficientemente sensibles y selectivas capaces de alcanzar los bajos niveles de concentración requeridos. Para garantizar estas exigencias se recurre a lo establecido en la Decisión de la Comisión 2002/657/EC y la guía SANTE/12682/2019, las cuales establecen el uso la cromatografía junto con la espectrometría de masas como mejores técnicas para la

separación y detección de contaminantes orgánicos en alimentos. Teniendo en cuenta el tipo de compuestos que se van a analizar en este trabajo (pesticidas y productos veterinarios) se va a realizar una discusión de los distintos métodos de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS).

La cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) es una de las técnicas de análisis más empleadas en la actualidad ya que ofrece un mecanismo de separación versátil y universal, siendo especialmente adecuado para el análisis de compuestos polares, poco volátiles y termolábiles. Esta técnica se basa en la distribución de los componentes de una mezcla entre una fase móvil líquida y una fase estacionaria. Es posible encontrar distintos tipos de HPLC en función del mecanismo de separación o del tipo de fase estacionaria: cromatografía de reparto (líquido-líquido), de adsorción (líquido-sólido), de intercambio iónico, de exclusión molecular, de afinidad y cromatografía quiral. De todos estos tipos la más empleada es la de reparto, en la que la fase estacionaria es un segundo líquido que es inmisible en la fase móvil líquida (Skoog *et al.*, 2014). Un esquema de los componentes de un cromatógrafo de líquidos se muestra en la Figura 6.

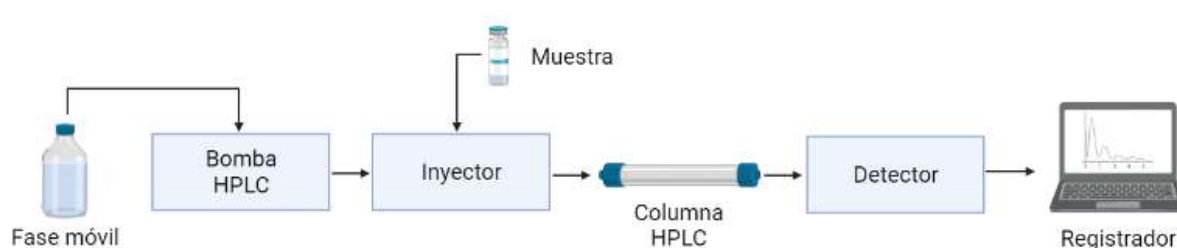


Figura 6. Componentes de un cromatógrafo de líquidos.

Un avance importante en la cromatografía de líquidos ha sido el desarrollo de columnas de cromatografía líquida de ultra alta eficacia (UHPLC). En este tipo de columnas se utilizan fases estacionarias empaquetadas con partículas de un tamaño menor de 2 μm , trabajando a altas presiones (> 400 bar) (Agilent Technologies., 2016). UHPLC se ha convertido en una técnica de rutina para el análisis de contaminantes en alimentos, especialmente en el estudio de pesticidas y productos veterinarios (Masiá *et al.*, 2016), debido a su capacidad para ofrecer una resolución de picos mejorada y una separación rápida con un consumo de disolvente reducido, a la vez que mantiene o aumenta la eficiencia y la resolución.

Como sistema de detección acoplado a la cromatografía de líquidos se va a emplear la espectrometría de masas (MS). Esta técnica se basa en la ionización de los componentes de la muestra mediante la aplicación de diferentes métodos según la naturaleza de la muestra que se quiere estudiar. Los diferentes iones formados van a ser separados en función de su relación masa/carga (m/z) y van a ser dirigidos a un registrador que va a convertir el número de iones (abundancia) en una señal eléctrica, dando lugar a lo que se conoce como espectro de masas (Skoog *et al.*, 2014). Los componentes de un espectrómetro de masas se muestran en la Figura 7.

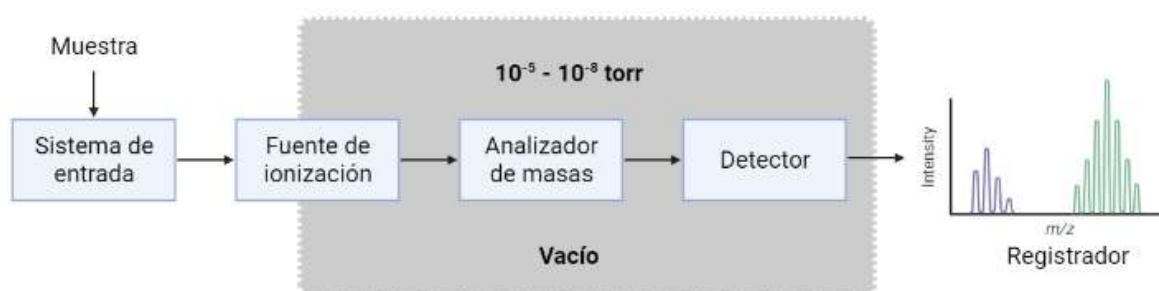


Figura 7. Componentes de un espectrómetro de masas.

Para conseguir el acoplamiento entre el cromatógrafo de líquidos y el espectrómetro de masas se hace uso de una fuente de ionización. La fuente de ionización más utilizada para el análisis de contaminantes orgánicos en alimentos mediante LC/MS es la ionización por electrospray (ESI) (Hird *et al.*, 2014), que ha sido utilizada en este trabajo. Esta técnica pertenece al grupo de las fuentes de ionización a presión atmosférica (API) y va a producir una ionización suave (poca fragmentación de las moléculas), de manera que la información obtenida en el análisis va a estar relacionada con la masa molecular de los analitos (Wilm, 2011). La ionización por electrospray permite obtener iones protonados ($[M+H]^+$) o desprotonados ($[M-H]^-$) en función de que se trabaje en modo de ionización positivo o negativo, respectivamente. Para la mayor parte de los pesticidas y productos veterinarios analizados se suele emplear el modo positivo (Masiá *et al.*, 2016), si bien también es posible encontrar algunos que se analizan en modo negativo, tales como chloramphenicol, nicarbazine o diclazuril (Tabla 8).

Los iones generados por la fuente de ionización son dirigidos hasta el analizador, a través del sistema de guiado de iones, siendo éste el encargado de separarlos en

función de su relación m/z mediante la aplicación de campos eléctricos y magnéticos. Existen diferentes tipos de analizadores los cuales se pueden clasificar de manera general en función de su resolución, definiéndose este parámetro como la capacidad para diferenciar entre dos iones con un valor de m/z muy similar. Así es posible encontrar analizadores de baja resolución ($R < 5000$), tales como el de trampa de iones (IT) y el cuadrupolar (Q), y de alta resolución ($R > 5000$) como el de tiempo de vuelo (TOF) o el orbitrap.

En los últimos años el campo de la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) ha experimentado un gran desarrollo debido a su capacidad para permitir una identificación inequívoca de los analitos mediante medidas de masa exacta (cuatro o más cifras decimales). Otra ventaja importante de esta técnica es la capacidad para realizar un análisis retrospectivo gracias a la adquisición en modo *full scan*, ofreciendo de esta manera la posibilidad de llevar a cabo un análisis de compuestos para los que en un principio no estaba dirigido el análisis o incluso de compuestos desconocidos (Kaufmann, 2011). La HRMS está siendo actualmente muy utilizada para el análisis de pesticidas y productos veterinarios en matrices alimentarias, siendo fundamentalmente empleados los analizadores de tiempo de vuelo (Sivaperumal *et al.*, 2015) y orbitrap (Gómez-Pérez *et al.*, 2014). Un analizador de tiempo de vuelo será el empleado en este trabajo.

Otro tipo de espectrometría de masas es la conocida como espectrometría de masas en tándem (MS/MS). El principio básico de esta técnica es la selección de un determinado ion precursor, fragmentación de este ión (generalmente por disociación inducida por colisión (CID)), y medición de la relación m/z de los iones producto formados. La información estructural adicional proporcionada esta técnica permite una identificación inequívoca de los analitos, siendo especialmente útil para el análisis de muestras complejas (Hird *et al.*, 2014). Es posible encontrar en bibliografía diferentes configuraciones que permiten realizar experimentos MS/MS, siendo los más frecuentes los instrumentos híbridos cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF) y trampa de iones lineal-orbitrap (LTQ-Orbitrap) (Hernández *et al.*, 2012). Otro de los analizadores que opera en modo MS/MS es el de triple cuadrupolo (QQQ), el cual es comúnmente empleado como alternativa a HRMS debido a su bajo coste y

facilidad de uso, siendo uno de los más utilizados para el análisis de residuos en muestras alimentarias (Luo *et al.*, 2019; Akgün *et al.*, 2020).

4. EXPERIMENTAL

4.1. Materiales y reactivos

Los patrones de los analitos estudiados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Buchs, Suiza) y Dr. Ehrenstorfer (Wesel, Alemania). Se prepararon disoluciones concentradas de 500 mg L⁻¹ de cada compuesto empleando metanol o acetonitrilo como disolvente y se almacenaron en el congelador a una temperatura de -18 °C. A partir de éstas, se prepararon dos disoluciones multipatrón de 5 mg L⁻¹ en metanol, conteniendo una de ellas los compuestos a analizar en modo de ionización positivo y la otra los del modo negativo. A partir de éstas últimas se prepararon las diferentes curvas de calibrado empleadas en el estudio. Los niveles de todas las curvas de calibrado fueron 10 µg L⁻¹, 50 µg L⁻¹, 100 µg L⁻¹, 250 µg L⁻¹, 500 µg L⁻¹ y 1000 µg L⁻¹, utilizando H₂O:MeOH (80:20 v/v) como disolvente. Todas las disoluciones fueron conservadas a -18 °C hasta su uso.

Los disolventes metanol, acetonitrilo y agua, de grado HPLC, así como el ácido fórmico de calidad HPLC-MS, se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania). El sulfato de magnesio anhidro se obtuvo de la casa comercial Panreac (Castellar del Vallès, Barcelona, España). Las sales cloruro de sodio, citrato sódico dihidratado y citrato sódico dibásico sesquihidratado se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania), al igual que la sal disódica dihidratada de EDTA. Para la extracción en fase sólida dispersiva se utilizaron tubos EMR-Lipid d-SPE y tubos EMR-Lipid Polish, de la casa comercial Agilent Technologies (Santa Clara, California, EE.UU.). Para la filtración de los extractos se emplearon filtros de PTFE de 0,45 µm de poro, obtenidos de Millipore (Billerica, MA, EE.UU.). Durante el procedimiento experimental también fueron utilizados una centrífuga Sartorius 2-16P, de Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, EE.UU.) y un evaporador TurboVap LV (Caliper Life Sciences, Waltham, MA, EE.UU.)

4.2. Tratamiento de muestra

Para llevar a cabo la etapa de tratamiento de muestra se va seguir un procedimiento recogido en el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para Residuos de Pesticidas en Alimentos de Origen Animal (EURL AO). Este método consta de una primera etapa en la que se realiza en una extracción QuEChERS, seguida de una fase de purificación basada en una d-SPE utilizando EMR-Lipid como sorbente (Lippold *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta que en este estudio se va a llevar a cabo una determinación conjunta de pesticidas y fármacos, este procedimiento va a ser desarrollado con diversas modificaciones respecto al original. Entre estas modificaciones se encuentra la adición de EDTA a las sales del QuEChERS, a fin de adaptar el método a la extracción de determinados analitos como tetraciclinas, macrólidos y fluoroquinolonas, tal y como se ha comentado anteriormente.

Para llevar a cabo la etapa de extracción se pesa una porción de 5 g de muestra en un tubo de centrífuga de 50 mL. A continuación, se añaden 10 mL de acetonitrilo y se agita el tubo manualmente durante 1 minuto. Seguidamente se adicionan 10 mL de una disolución de Na₂EDTA de concentración 0.1 M y se agita de nuevo el tubo durante 1 minuto. En el siguiente paso se añaden 4 g de MgSO₄ anhidro, 1 g de NaCl, 0.5 g Na₂H-citrato·1.5 H₂O y 1.0 g Na₂-citrato·2 H₂O. Tras agitar manualmente durante 3 minutos, se centrifuga a 4000 rpm durante 5 minutos. Una vez separadas ambas fases, se transfieren 5 mL del sobrenadante a un tubo EMR-Lipid d-SPE, el cual previamente debe ser activado mediante la adición de 5 mL de H₂O. Una vez hecho esto, se agita manualmente durante 1 minuto, y se centrifuga a 5000 rpm durante 5 minutos. A continuación, se transfieren 5 mL del sobrenadante obtenido en la última centrifugación a un tubo EMR-Lipid Polish (contiene una mezcla de 2 g de MgSO₄ anhidro y NaCl en proporción 1:4). Se agita el tubo enérgicamente durante 1 minuto y posteriormente se centrifuga a 5000 rpm durante 5 minutos. Se toman 2 mL del extracto obtenido y se evapora hasta casi sequedad en corriente de N₂. Posteriormente se reconstituye hasta un volumen de 1 mL empleando H₂O:MeOH (80:20 v/v) como disolvente. Finalmente, el extracto se filtra a través de un filtro PTFE de 0.45 µm y es transferido a un vial de cromatografía. El esquema de todo el procedimiento experimental queda recogido en la Figura 8.

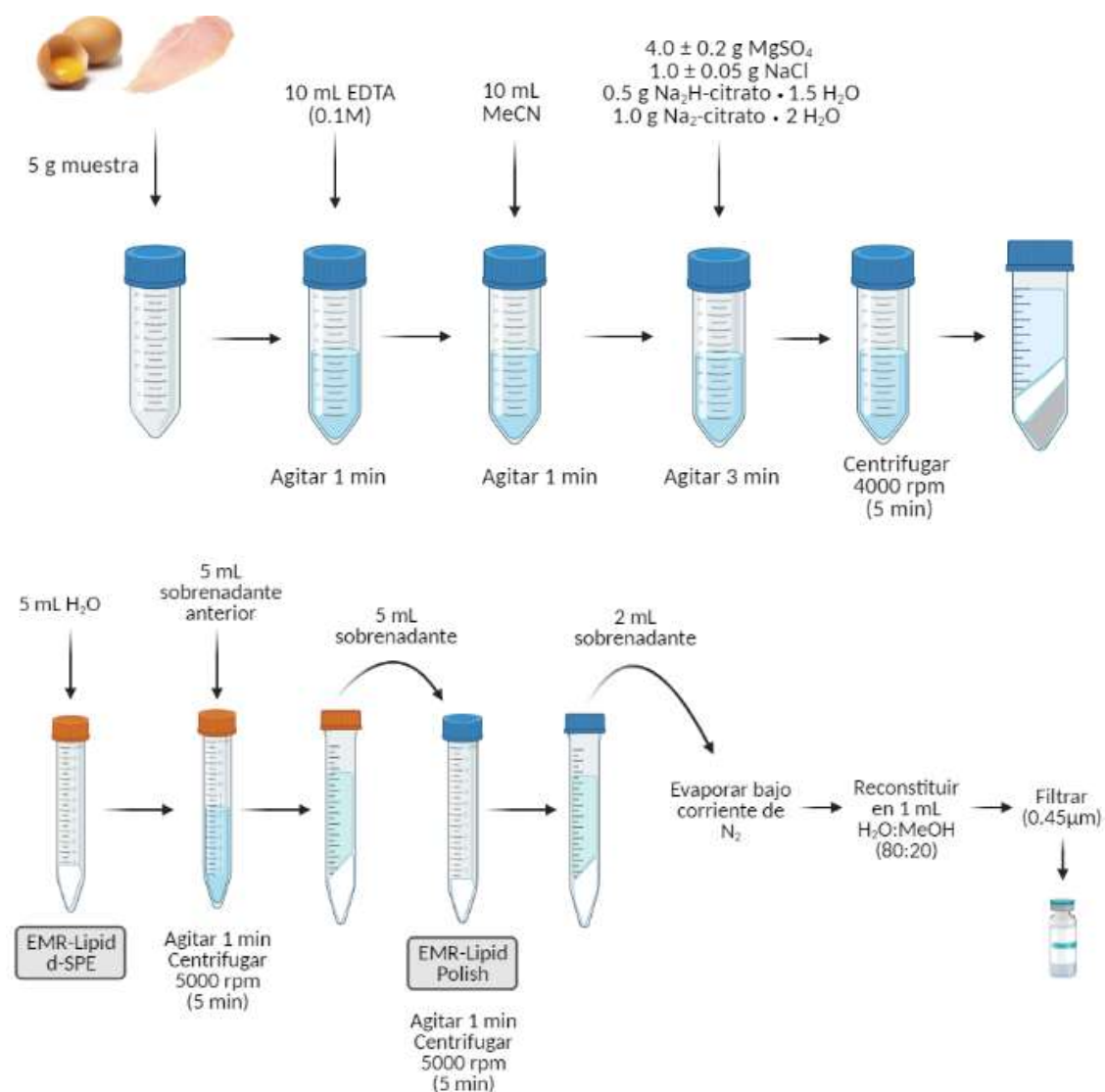


Figura 8. Tratamiento de muestra basado en el método QuEChERS.

4.3. Instrumentación

El equipo empleado para llevar a cabo el estudio fue un cromatógrafo de líquidos UHPLC (Agilent Series 1290 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). Para conseguir la separación de los analitos se utilizó una columna de fase reversa Zorbax Eclipse Plus C₁₈ Rapid Resolution HD 2.1 x 50 mm y 1.8 μm de tamaño de partícula (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.).

Las fases móviles empleadas fueron agua (fase A) y acetonitrilo (fase B), ambas con 0.1% de ácido fórmico. El gradiente utilizado para realizar la elución de los analitos mantuvo constante la composición de la fase móvil inicial (5% de B) durante 2 minutos. A continuación, fue seguido de un gradiente lineal hasta alcanzar el 100% de B a los 8 minutos y, por último, se mantuvo constante durante 2 minutos al 100% de B. La velocidad de flujo empleada durante todo el gradiente se mantuvo constante a 0.5 mL min⁻¹. El volumen de inyección fue de 20 µL de extracto para cada uno de los análisis. El tiempo total empleado en el análisis fue de 10 minutos (Tabla 6), seguido de un periodo de *post-run* de 5 minutos en el que se vuelve a las condiciones iniciales a fin de acondicionar la columna para el siguiente análisis.

Tabla 6. Gradiente de elución empleado en el análisis.

Tiempo (min)	% B (MeCN)
0	5
2	5
8	100
10	100

El cromatógrafo de líquidos se acopló a un espectrómetro de masas con un analizador de tiempo de vuelo (Agilent 6220 TOF, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI), operando tanto en modo positivo como negativo. Los parámetros empleados para el análisis en el espectrómetro de masas quedan recogidos en la Tabla 7.

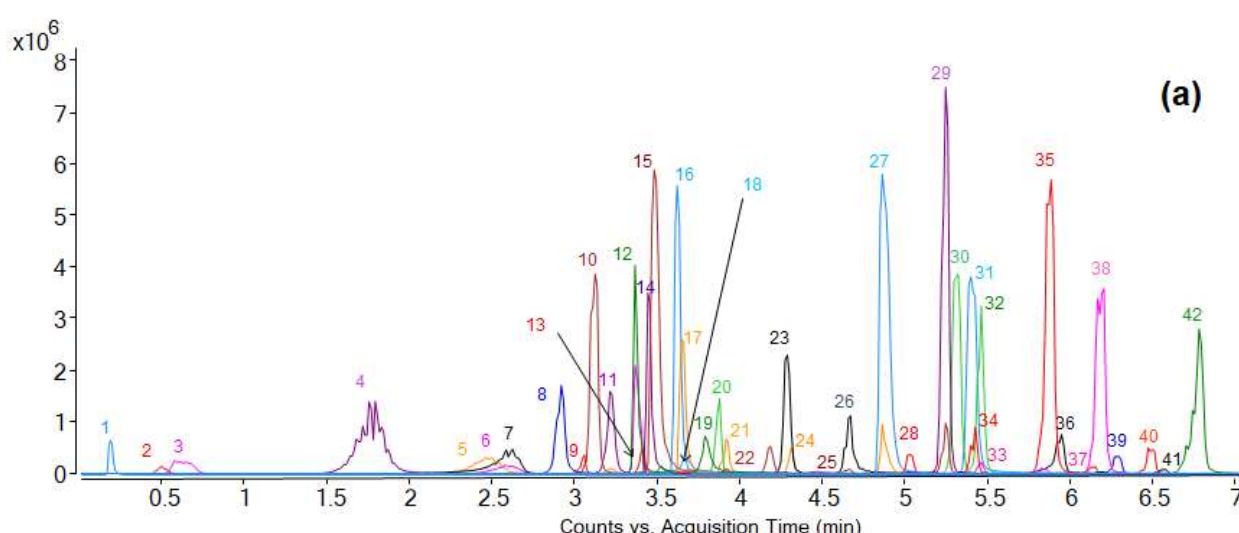
Tabla 7. Parámetros empleados en el espectrómetro de masas.

Parámetro	Valor
Voltaje del capilar	4000 V
Voltaje de fragmentación	190 V
Presión del gas de nebulización	40 psig
Flujo del gas de secado	9 L min ⁻¹
Temperatura del gas de secado	325°C
Rango de masas	50-1100 <i>m/z</i>

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Desarrollo del método HPLC-TOFMS

Para llevar a cabo el análisis de los pesticidas y productos veterinarios seleccionados se propuso un método basado en el empleo de un equipo HPLC-TOFMS. Puesto que dentro de los analitos seleccionados se incluían compuestos que se analizan en modo de ionización positivo y otros en modo negativo, fue necesario el desarrollo de dos métodos diferentes, uno mediante HPLC-ESI(+) TOFMS y otro mediante HPLC-ESI(-) TOFMS. Para la selección de las condiciones cromatográficas y de ionización iniciales (recogidas en el apartado 4.3.) se tomó como referencia un método previamente publicado (Pérez-Ortega *et al.*, 2016). La optimización de la separación cromatográfica se llevó a cabo mediante la inyección de una disolución de 1 mg L^{-1} de concentración, preparada en $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (80:20 v/v), que contenía una mezcla de todos los compuestos a analizar en ionización positiva. Este mismo procedimiento se repitió para la mezcla de compuestos de ionización negativa. Tal y como puede apreciarse en la Figura 9, una buena separación cromatográfica es posible en un corto tiempo de análisis (10 minutos) mediante el empleo de agua (0.1% ácido fórmico) y acetonitrilo (0.1% ácido fórmico) como fases móviles.



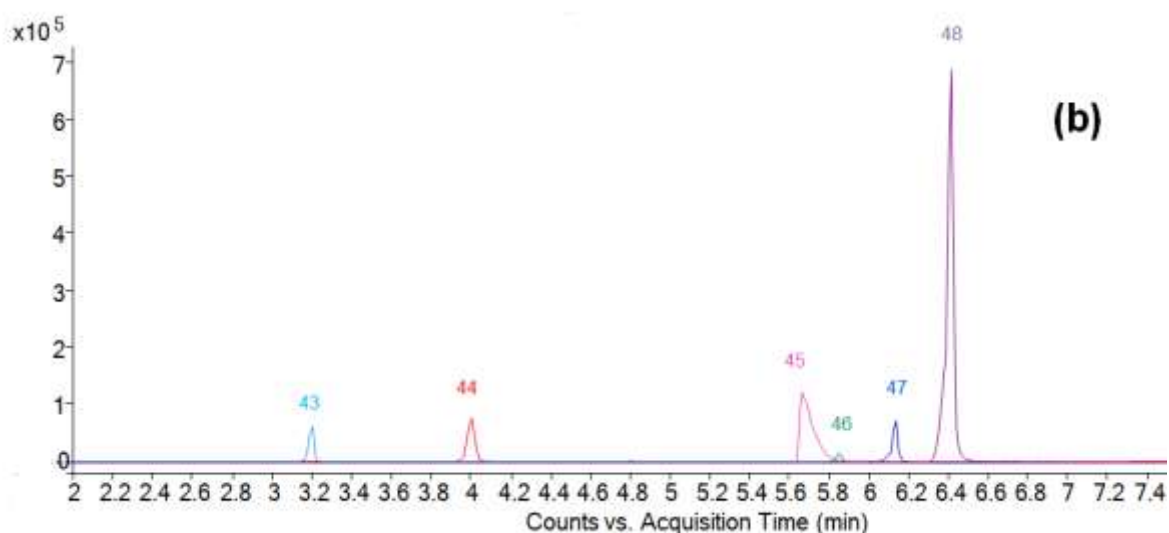


Figura 9. (a) Superposición de cromatogramas extraídos (EICs) de los analitos estudiados en modo de ionización positivo. (b) Superposición de cromatogramas extraídos (EICs) de los analitos estudiados en modo de ionización negativo.

La identificación de cada uno de los compuestos a analizar se llevó a cabo teniendo en cuenta el tiempo de retención (t_R) y la medida de masa exacta de la molécula protonada ($[M+H]^+$) o desprotonada ($[M-H]^-$). Para la identificación y cuantificación de los analitos se obtuvo en primer lugar el cromatograma de iones totales (*TIC, Total Ion Current*). A partir de éste se obtuvieron los cromatogramas extraídos de los diferentes iones (*EIC, Extracted Ion Chromatogram*) utilizando para ello los valores de la relación m/z exacta de cada analito con una ventana de error de masa de 20 ppm (error de masa relativo). Con el propósito de confirmar la identificación de los analitos también es posible utilizar la información proporcionada por los diferentes fragmentos, así como la presencia de patrones isotópicos, particularmente en aquellas moléculas que contienen átomos de cloro, bromo o azufre en su composición. A modo de ejemplo, en la Figura 10 se muestra el procedimiento a seguir para la identificación del compuesto chloramphenicol, incluyendo además el empleo de fragmentos y del patrón isotópico de cloro para su confirmación.

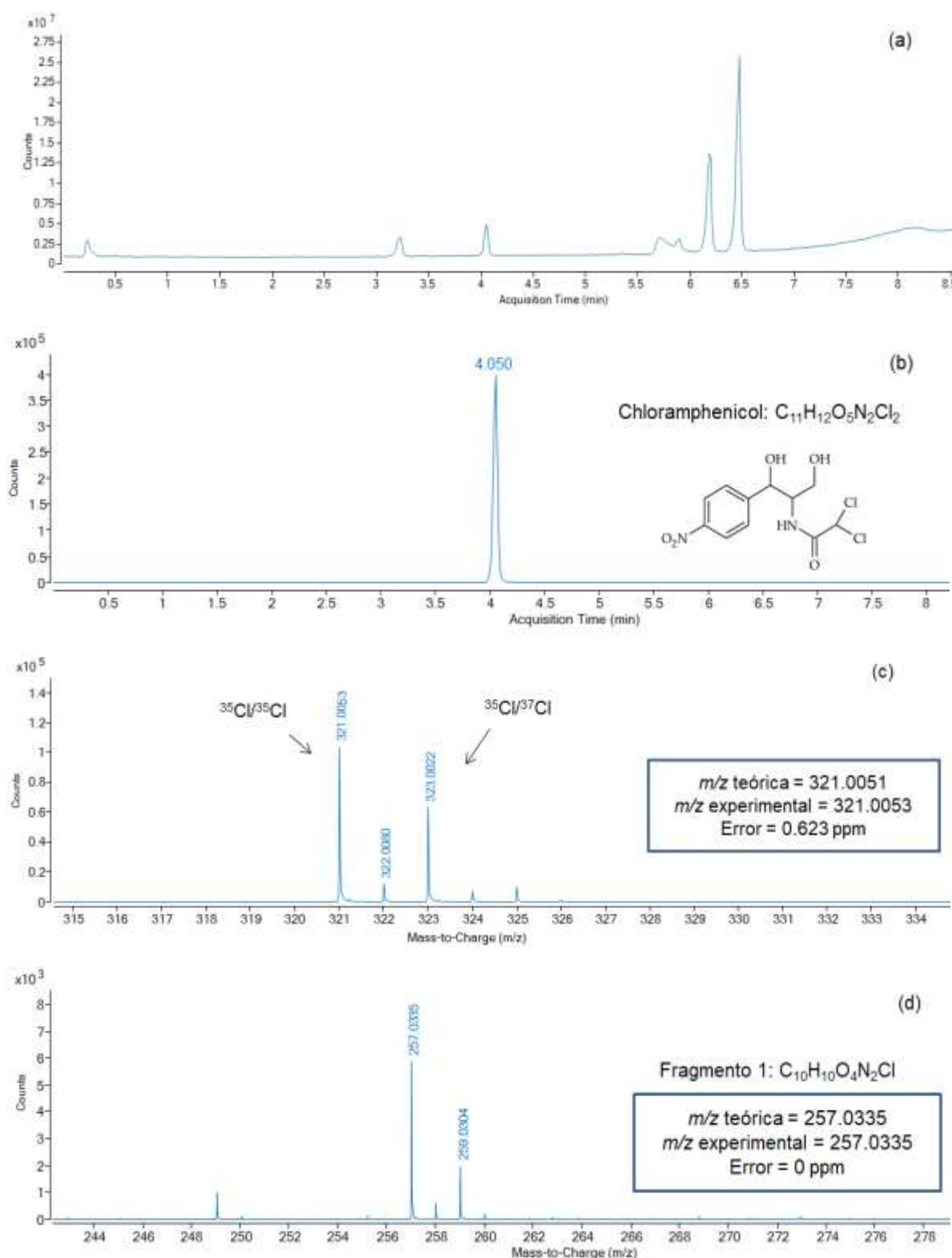


Figura 10. (a) Cromatograma de iones totales (TIC) correspondiente a una disolución de 1 mg L^{-1} conteniendo la mezcla de analitos de ionización negativa. (b) EIC de chloramphenicol a partir de la relación m/z exacta de la molécula desprotonada ($[M-H]^-$). (c) Espectro de masas y perfil isotópico de cloro. (d) Espectro de masas de un fragmento de chloramphenicol.

Los resultados obtenidos para la identificación de los 48 compuestos a analizar se muestran en la Tabla 8. La molécula protonada ($[M+H]^+$) (o desprotonada ($[M-H]^-$) para el caso de ionización negativa) fue utilizada para la identificación y cuantificación de la mayoría de los analitos, excepto para el caso de alachlor, acephate y piperonyl butoxide, los cuales fueron caracterizados en cada caso a partir de uno de sus fragmentos. Los errores de masa obtenidos fueron inferiores a 10 ppm (error de masa relativo) en todos los casos. Por lo tanto, las medidas de masa exacta de los iones y fragmentos característicos, así como la medida de los tiempos de retención, permitieron la identificación y confirmación de los diferentes analitos estudiados.

Tabla 8. Identificación de los compuestos estudiados.

Compuesto	Composición elemental	Ion detectado	t_R (min)	m/z teórico
Chlortetracycline	$C_{22}H_{23}ClN_2O_8$	$[M+H]^+$	3.83	479.1216
Cloxacillin	$C_{19}H_{18}ClN_3O_5S$	$[M+H]^+$	5.05	436.0728
Danofloxacin	$C_{19}H_{20}FN_3O_3$	$[M+H]^+$	3.49	358.1561
Lincomycin	$C_{18}H_{34}N_2O_6S$	$[M+H]^+$	2.76	407.2210
Spiramycin	$C_{43}H_{74}N_2O_{14}$	$[M+H]^+$	3.71	843.5213
Flumequine	$C_{14}H_{12}FNO_3$	$[M+H]^+$	4.66	262.0874
Erythromycin	$C_{37}H_{67}NO_{13}$	$[M+H]^+$	4.24	734.4685
Trimethoprim	$C_{14}H_{18}N_4O_3$	$[M+H]^+$	3.16	291.1452
Sulfathiazole	$C_9H_9N_3O_2S_2$	$[M+H]^+$	2.36	256.0209
Ampicillin	$C_{16}H_{19}N_3O_4S$	$[M+H]^+$	3.12	350.1169
Sulfanilamide	$C_6H_8N_2O_2S$	$[M+H]^+$	0.48	173.0379
Sarafloxacin	$C_{20}H_{17}F_2N_3O_3$	$[M+H]^+$	3.66	386.1311
Sulfamethazine	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$	$[M+H]^+$	3.15	279.0910
Ciprofloxacin Chlorhydrate	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$	$[M+H]^+$	3.4	332.1405
Sulfapyridine	$C_{11}H_{11}N_3O_2S$	$[M+H]^+$	2.22	250.0645
Sulfamethizole	$C_9H_{10}N_4O_2S_2$	$[M+H]^+$	3.37	271.0318
Difloxacin	$C_{21}H_{19}F_2N_3O_3$	$[M+H]^+$	3.7	400.1467
Tilmicosin	$C_{46}H_{80}N_2O_{13}$	$[M+H]^+$	3.99	869.5733
Fenbendazole	$C_{15}H_{13}N_3O_2S$	$[M+H]^+$	4.81	300.0801
Enrofloxacin	$C_{19}H_{22}FN_3O_3$	$[M+H]^+$	3.52	360.1718
Sulfadimethoxine	$C_{12}H_{14}N_4O_4S$	$[M+H]^+$	4.28	311.0809
Robenidine	$C_{18}H_{23}NO_3$	$[M+H]^+$	5.46	302.1751
Levamisole	$C_{11}H_{12}N_2S$	$[M+H]^+$	1.92	205.0794
Sulfaquinoxaline	$C_{14}H_{12}N_4O_2S$	$[M+H]^+$	4.3	301.0754

Tabla 8. Identificación de los compuestos estudiados (continuación).

Compuesto	Composición elemental	Ion detectado	t _R (min)	m/z teórico
Terbutylazine	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	[M+H] ⁺	5.4	230.1167
Alachlor	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	[C ₁₁ H ₁₆ N] ⁺	5.94	162.1277
Acetamiprid	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	[M+H] ⁺	3.87	223.0745
Thiabendazole	C ₁₀ H ₇ N ₃ S	[M+H] ⁺	2.93	202.0433
Difenoconazole	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	[M+H] ⁺	6.18	406.0720
Amitrole	C ₂ H ₄ N ₄	[M+H] ⁺	0.24	85.0509
Spinosyn A	C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₀	[M+H] ⁺	5.34	732.4681
Spinosyn D	C ₄₂ H ₆₇ NO ₁₀	[M+H] ⁺	5.52	746.4838
Acephate	C ₄ H ₁₀ NO ₃ PS	[C ₂ H ₉ O ₃ PS] ⁺	0.63	142.9926
Carbofuran	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	[M+H] ⁺	4.63	222.1125
Aclonifen	C ₁₂ H ₉ ClN ₂ O ₃	[M+H] ⁺	6.09	265.0374
Disulfoton	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₃	[C ₄ H ₈ S] ⁺	6.53	89.0420
Fenthion	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	[M+H] ⁺	6.27	279.0273
Paclobutrazol	C ₁₅ H ₂₀ ClN ₃ O	[M+H] ⁺	5.31	294.1368
Piperonyl Butoxide	C ₁₉ H ₃₀ O ₅	[C ₁₁ H ₁₃ O ₂] ⁺	6.78	177.0910
Spirotetramat	C ₂₁ H ₂₇ NO ₅	[M+H] ⁺	5.46	374.1962
Metconazole	C ₁₇ H ₂₂ ClN ₃ O	[M+H] ⁺	5.87	320.1524
Fluralaner	C ₂₂ H ₁₇ Cl ₂ F ₆ N ₃ O ₃	[M+H] ⁺	6.48	556.0624
Thiamphenicol	C ₁₂ H ₁₅ Cl ₂ NO ₅ S	[M-H] ⁻	3.18	353.9975
Chloramphenicol	C ₁₁ H ₁₂ O ₅ N ₂ Cl ₂	[M-H] ⁻	4.04	321.0051
Nicarbazine	C ₁₉ H ₁₈ N ₆ O ₆	[M-H] ⁻	5.65	301.0573
Diclazuril	C ₁₇ H ₉ Cl ₃ N ₄ O ₂	[M-H] ⁻	5.84	404.9718
Fipronil	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS	[M-H] ⁻	6.13	434.9313
Fipronil Sulfone	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ O ₂ S	[M-H] ⁻	6.41	450.9263

5.2. Parámetros analíticos

Con objeto de evaluar la eficacia del método desarrollado, se llevó a cabo el estudio de diferentes parámetros analíticos. Para ello se prepararon curvas de calibrado de cada uno de los compuestos a analizar, tanto en disolvente como en las matrices de huevo y pollo, en un intervalo de concentraciones de 10 a 1000 µg L⁻¹. Los resultados de todos los parámetros evaluados quedan recogidos en la Tabla 9, en la

cual se muestra el rango dinámico lineal (LDR), el coeficiente de regresión, el límite de cuantificación (LOQ), el efecto matriz y el porcentaje de recuperación.

En lo referente a la linealidad, los coeficientes de regresión obtenidos permiten afirmar que se trata de un método lineal para el que existe una relación directamente proporcional entre la respuesta obtenida y la concentración del analito, dentro del rango de concentraciones de trabajo. Excepto en el caso de spiramycin, ampicillin y robenidone, todos los coeficientes de regresión fueron superiores a 0.99, tanto en el calibrado en disolvente como en el de huevo y pollo. Un ejemplo de la buena linealidad obtenida se muestra en la Figura 11.

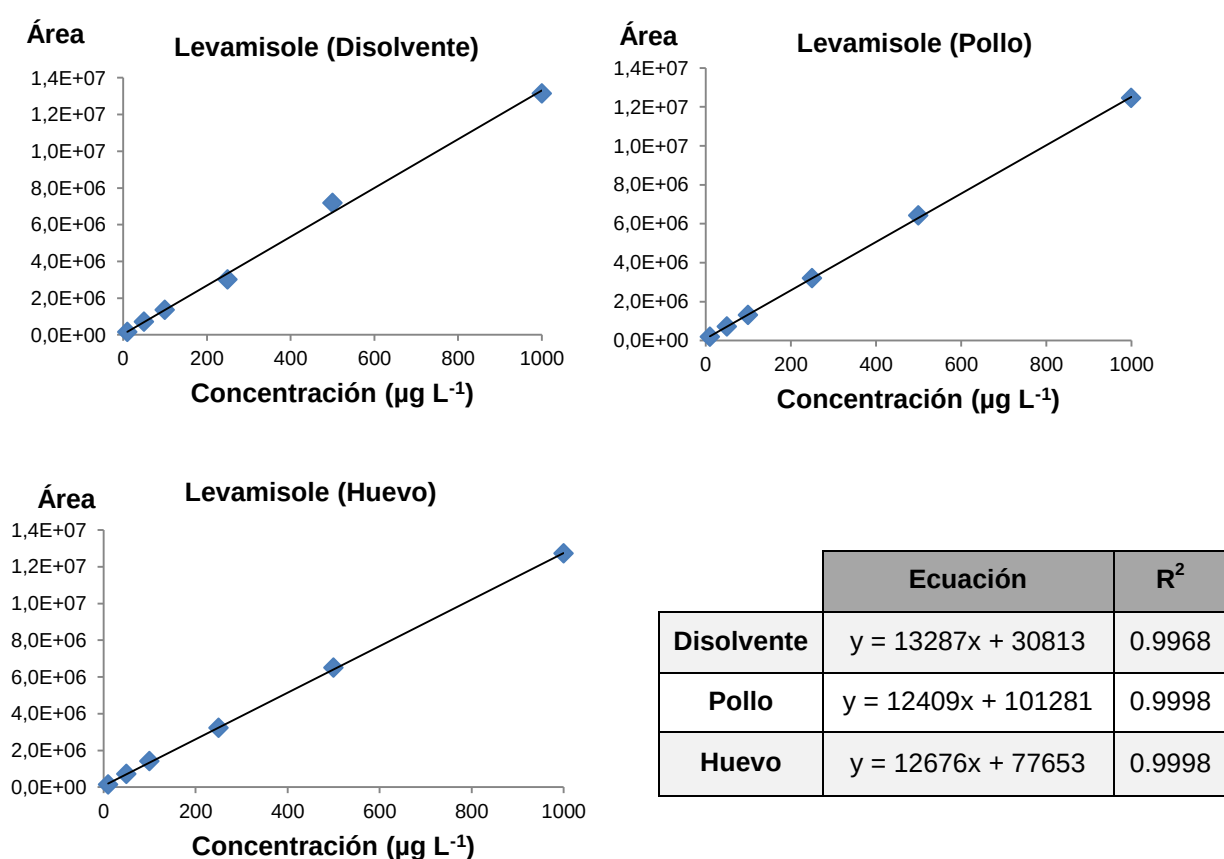


Figura 11. Curvas de calibrado obtenidas para el compuesto levamisole en disolvente, carne de pollo y huevo.

El límite de cuantificación (LOQ) queda definido como la mínima concentración de analito a partir de la cual es posible obtener una relación señal/ruido (S/N) igual a 10. Para el cálculo de los LOQs se utilizó la relación S/N obtenida para el nivel más bajo

de la curva de calibrado. Tal y como puede verse en la Tabla 9, todos los LOQs calculados se encuentran por debajo de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, llegándose a obtener valores comprendidos entre $0.05\text{-}0.15 \mu\text{g L}^{-1}$ en los tres calibrados estudiados en compuestos como trimethoprim, fenbendazole, difenoconazole, paclobutrazol, metconazole, fipronil y fipronil sulfone. Esto permite confirmar la buena sensibilidad del método aplicado. Además, comparando los LOQs calculados con los LMRs fijados para cada analito (Tabla 4), puede observarse cómo todos los LOQs obtenidos se encuentran por debajo de los límites establecidos por la legislación de los diferentes compuestos, lo cual garantiza la correcta cuantificación de los mismos mediante la aplicación del método desarrollado. Estos LOQs fueron utilizados para la evaluación del rango dinámico lineal, cuyo límite inferior queda determinado por el valor de LOQ calculado, y su límite superior por el nivel de concentración más alto del tramo lineal de la curva de calibrado. Tal y como se muestra en la Tabla 9, un intervalo de hasta tres órdenes de magnitud es posible obtener para la mayoría de los analitos.

Otro parámetro analítico evaluado fue el efecto matriz. Este efecto se entiende como la influencia que uno o varios componentes de la muestra pueden ejercer en la medición de la concentración o la masa de analito, pudiendo provocar un aumento o disminución de la señal analítica. La presencia o ausencia de estos efectos se puede demostrar comparando la respuesta producida por el analito en una solución de disolvente con la obtenida para la misma cantidad de analito en un extracto de muestra. Para ello se compararon las pendientes de las rectas de calibrado en matriz y las pendientes de las rectas de calibrado en disolvente, apareciendo este efecto matriz siempre que el valor obtenido para la relación de pendientes sea muy distinto de 1. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9. Se puede considerar que existe un efecto matriz despreciable cuando el valor obtenido para la relación de pendientes (expresado en porcentaje) se encuentra entre el 0-10%, suave para el intervalo 10-20%, medio para 20-50% y fuerte cuando se encuentra por encima del 50%. Una comparación del efecto matriz existente en huevo y en carne de pollo queda reflejada en la Figura 12.

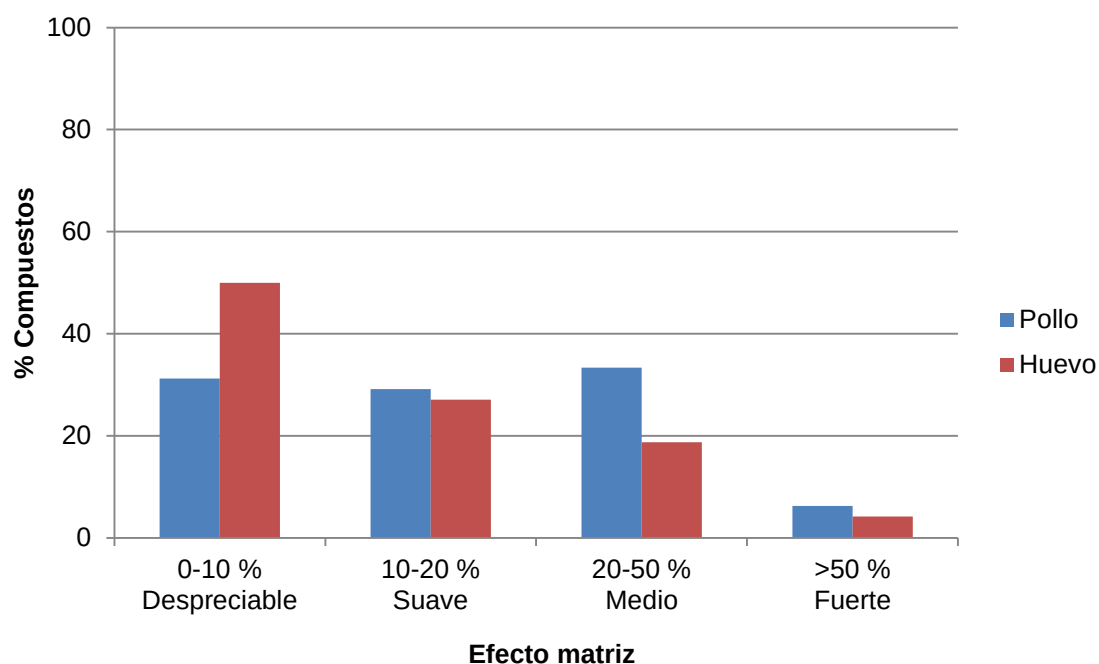


Figura 12. Estudio del efecto matriz expresado en porcentaje (aumento o supresión de señal) para los diferentes compuestos analizados en carne de pollo y huevo.

Tal y como se muestra en la figura anterior, para buena parte de los compuestos analizados se observa un efecto matriz suave o despreciable (< 20%) tanto en pollo (60% de los compuestos) como en huevo (77% de los compuestos). De los 48 compuestos estudiados, tan solo 3 de ellos en pollo (6%) y 2 en huevo (4%) mostraron un efecto matriz superior al 50%. Una posible forma de minimizar este efecto sería llevar a cabo una dilución de los extractos, si bien es cierto que niveles elevados de dilución podrían reducir la sensibilidad analítica del análisis LC/MS por lo que este parámetro debería optimizarse durante el desarrollo y la validación del método para asegurar la calidad de los datos obtenidos (Stahnke *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015). De manera general, se observa como el efecto matriz es inferior en la matriz huevo que en la de pollo. Esto podría deberse al tratamiento de muestra empleado ya que, aunque el huevo presenta una matriz más compleja que en el caso de la carne de pollo, el empleo de EMR-Lipid como sorbente durante la etapa de *clean-up* permitiría eliminar un mayor número de interferentes, puesto que su aplicación es especialmente útil en matrices grasas.

A continuación, se muestra la Tabla 9, que recoge los diferentes parámetros analíticos anteriormente comentados.

Tabla 9. Parámetros analíticos obtenidos para los compuestos estudiados en disolvente, pollo y huevo.

Compuesto	Disolvente			Pollo					Huevo				
	LDR ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R ²	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LDR ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R ²	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Efecto matriz	%Rec.	LDR ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R ²	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Efecto matriz	%Rec.
Chlortetracycline	0.74-1000	0.9980	0.74	0.75-1000	0.9980	0.75	1.02	2.8	0.53-1000	0.9991	0.53	0.97	1.1
Cloxacillin	0.88-1000	0.9999	0.88	0.80-1000	0.9980	0.80	0.74	109.5	1.27-1000	0.9995	1.27	0.83	118.2
Danofloxacin	1.59-1000	0.9973	1.59	0.19-500	0.9920	0.19	0.69	19.6	0.19-500	0.9958	0.19	1.06	4.5
Lincomycin	0.63-1000	0.9940	0.63	0.76-1000	0.9953	0.76	0.92	6.9	0.70-1000	0.9966	0.70	0.89	16.0
Spiramycin	4.63-1000	0.9823	4.63	0.57-1000	0.9875	0.57	1.04	122.4	2.62-1000	0.9980	2.62	1.39	99.3
Flumequine	0.66-1000	0.9975	0.66	0.53-1000	0.9978	0.53	1.05	83.9	0.84-1000	0.9966	0.84	1.20	75.0
Erythromycin	0.05-500	0.9984	0.05	0.28-500	0.9923	0.28	0.44	121.9	0.11-500	0.9946	0.11	0.92	87.5
Trimethoprim	0.09-500	0.9999	0.09	0.08-1000	0.9977	0.08	0.87	90.6	0.10-1000	0.9921	0.10	0.88	77.1
Sulfathiazole	1.22-1000	0.9981	1.22	2.67-1000	0.9996	2.67	0.63	135.4	2.61-1000	0.9974	2.61	0.96	76.5
Ampicillin	1.37-500	0.9902	1.37	1.48-1000	0.9984	1.48	1.35	16.5	1.51-500	0.9896	1.51	0.98	5.3
Sulfanilamide	3.75-1000	0.9995	3.75	1.07-100	1.0000	1.07	0.55	188.9	4.55-1000	0.9989	4.55	0.28	79.9
Sarafloxacin	0.26-1000	0.9986	0.26	0.24-1000	0.9981	0.24	0.93	43.9	0.05-1000	0.9975	0.05	0.99	18.9
Sulfamethazine	0.49-1000	0.9995	0.49	0.39-1000	0.9980	0.39	0.96	137.4	0.43-500	0.9980	0.43	1.45	76.8
Ciprofloxacin Chlorhydrate	10.10-500	0.9963	10.10	1.68-500	0.9952	1.68	1.09	7.9	1.45-500	0.9961	1.45	1.21	0.9
Sulfapyridine	1.16-1000	0.9999	1.16	0.94-1000	0.9996	0.94	1.00	125.9	1.07-500	0.9960	1.07	1.54	90.5
Sulfamethizole	1.15-1000	0.9992	1.15	1.17-1000	0.9968	1.17	0.99	123.7	1.42-1000	0.9977	1.42	0.96	132.0
Difloxacin	0.28-1000	0.9961	0.28	0.29-1000	0.9958	0.29	0.99	67.1	0.15-1000	0.9980	0.15	1.08	22.1
Tilmicosin	3.69-1000	0.9985	3.69	0.68-1000	0.9987	0.68	1.15	110.2	0.99-1000	0.9975	0.99	1.00	101.9

Tabla 9. Parámetros analíticos obtenidos para los compuestos estudiados en disolvente, pollo y huevo (continuación).

Compuesto	Disolvente			Pollo					Huevo				
	LDR ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R ²	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LDR ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R ²	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Efecto matriz	%Rec.	LDR ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R ²	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Efecto matriz	%Rec.
Fenbendazole	0.07-1000	0.9981	0.07	0.09-500	0.9951	0.09	1.39	50.2	0.14-500	0.9996	0.14	1.15	58.5
Enrofloxacin	0.90-500	0.9976	0.90	0.22-500	0.9936	0.22	0.89	42.3	0.20-500	0.9989	0.20	0.99	15.3
Sulfadimethoxine	0.12-1000	0.9965	0.12	0.21-1000	0.9959	0.21	0.98	131.7	0.30-1000	0.9996	0.30	1.01	143.3
Robenidine	0.17-500	0.9878	0.17	1.81-500	0.9996	1.81	0.76	122.3	1.47-500	0.9969	1.47	1.18	75.3
Levamisole	0.80-1000	0.9968	0.80	0.72-1000	0.9998	0.72	0.93	92.8	0.93-1000	0.9998	0.93	0.95	83.4
Sulfaquinoxaline	0.40-500	0.9964	0.40	0.87-1000	0.9998	0.87	1.14	132.3	0.87-1000	0.9992	0.87	1.14	106.2
Terbutylazine	0.06-500	0.9979	0.06	0.17-500	0.9973	0.17	0.88	101.7	0.27-1000	0.9999	0.27	0.95	84.1
Alachlor	0.52-1000	0.9981	0.52	0.93-1000	0.9963	0.93	0.83	87.0	1.46-1000	0.9976	1.46	0.91	101.6
Acetamiprid	1.35-500	0.9975	1.35	1.66-100	0.9977	1.66	0.74	118.8	2.00-1000	0.9998	2.00	0.83	108.4
Thiabendazole	0.20-1000	0.9992	0.20	0.28-1000	1.0000	0.28	0.92	78.8	0.18-1000	0.9991	0.18	0.94	90.3
Difenoconazole	0.06-1000	0.9975	0.06	0.11-1000	0.9996	0.11	1.37	41.2	0.12-1000	0.9979	0.12	0.99	63.9
Amitrole	0.40-1000	0.9992	0.40	1.49-1000	0.9950	1.49	0.03	67.7	2.67-1000	0.9999	2.67	0.20	6.1
Spinosyn A	0.17-1000	0.9991	0.17	0.19-1000	0.9951	0.19	0.84	109.2	0.11-1000	0.9930	0.11	0.97	90.7
Spinosyn D	2.16-500	0.9999	2.16	0.98-500	0.9991	0.98	0.89	68.2	1.53-500	0.9978	1.53	1.10	50.6
Acephate	1.62-1000	0.9991	1.62	4.26-1000	0.9987	4.26	0.34	105.5	2.89-500	0.9912	2.89	0.99	73.9
Carbofuran	4.76-500	0.9981	4.76	2.66-1000	0.9992	2.66	0.66	128.9	9.71-1000	0.9998	9.71	0.71	107.6
Aclonifen	2.79-1000	0.9961	2.79	3.75-1000	0.9982	3.75	0.78	64.1	5.88-1000	0.9998	5.88	0.82	89.1
Disulfoton	2.30-500	0.9992	2.30	6.49-500	0.9961	6.49	0.77	86.1	5.35-1000	0.9988	5.35	0.70	71.7

Tabla 9. Parámetros analíticos obtenidos para los compuestos estudiados en disolvente, pollo y huevo (continuación).

Compuesto	Disolvente			Pollo					Huevo				
	LDR ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R ²	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LDR ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R ²	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Efecto matriz	%Rec.	LDR ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R ²	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Efecto matriz	%Rec.
Fenthion	0.92-500	0.9973	0.92	1.23-500	0.9999	1.23	0.79	76.3	1.21-1000	0.9999	1.21	0.75	112.2
Paclobutrazol	0.08-1000	0.9992	0.08	0.13-1000	0.9995	0.13	0.61	116.0	0.06-500	0.9982	0.06	0.83	118.9
Piperonyl Butoxide	0.11-250	0.9915	0.11	0.24-100	0.9968	0.24	1.11	107.2	0.49-100	0.9856	0.49	1.04	61.2
Spirotetramat	0.25-1000	0.9951	0.25	0.39-500	0.9964	0.39	1.20	112.4	0.56-1000	0.9971	0.56	1.14	80.0
Metconazole	0.13-500	0.9999	0.13	0.08-500	0.9986	0.08	0.87	61.9	0.05-500	0.9998	0.05	0.96	73.2
Fluralaner	0.49-500	0.9994	0.49	0.61-500	0.9986	0.61	0.90	32.7	0.47-1000	0.9975	0.47	0.91	42.0
Thiamphenicol	0.24-500	0.9981	0.24	0.46-1000	0.999	0.46	0.96	108.3	0.39-1000	0.9981	0.39	0.97	91.9
Chloramphenicol	0.17-500	0.998	0.17	0.26-500	0.9956	0.26	0.99	93.4	0.01-1000	0.9912	0.01	0.95	119.1
Nicarbazine	0.52-1000	0.9924	0.52	0.41-500	0.9925	0.41	1.66	47.2	0.21-500	0.9955	0.21	1.29	70.3
Diclazuril	0.62-500	0.9987	0.62	0.54-500	0.9855	0.54	0.90	40.2	0.88-1000	0.996	0.88	0.86	56.3
Fipronil	0.09-1000	0.9991	0.09	0.07-500	0.9973	0.07	1.26	84.6	0.09-1000	0.9975	0.09	1.16	96.8
Fipronil Sulfone	0.04-500	0.999	0.04	0.05-500	0.9993	0.05	1.10	55.9	0.03-1000	0.9932	0.03	1.03	73.9

5.3. Estudio de recuperación

Un estudio de recuperación fue llevado a cabo a fin de evaluar la eficacia de extracción del tratamiento de muestra propuesto. Para ello se fortificaron muestras de pollo y de huevo (3 réplicas de cada matriz) a un nivel de concentración de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ y se siguió el tratamiento de muestra descrito en el apartado 4.2. Puesto que durante el protocolo de extracción la muestra no es sometida a ninguna etapa de dilución o preconcentración, patrones de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de las mezclas de analitos en pollo y en huevo fueron utilizados para la obtención del porcentaje de recuperación. El cálculo de este porcentaje se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Área muestra fortificada}}{\text{Área patrón en matriz}} \cdot 100$$

Los resultados obtenidos quedan recogidos en la Tabla 9, mostrando una adecuada recuperación para buena parte de los compuestos analizados. De acuerdo con lo establecido en la Guía SANTE/12682/2019, un porcentaje mínimo del 30% es necesario para considerar aceptable la recuperación del método estudiado. Como puede verse en la Figura 13, un 63% de los analitos presentan una recuperación superior al 70% en pollo, alcanzando un 69% para el caso del huevo.

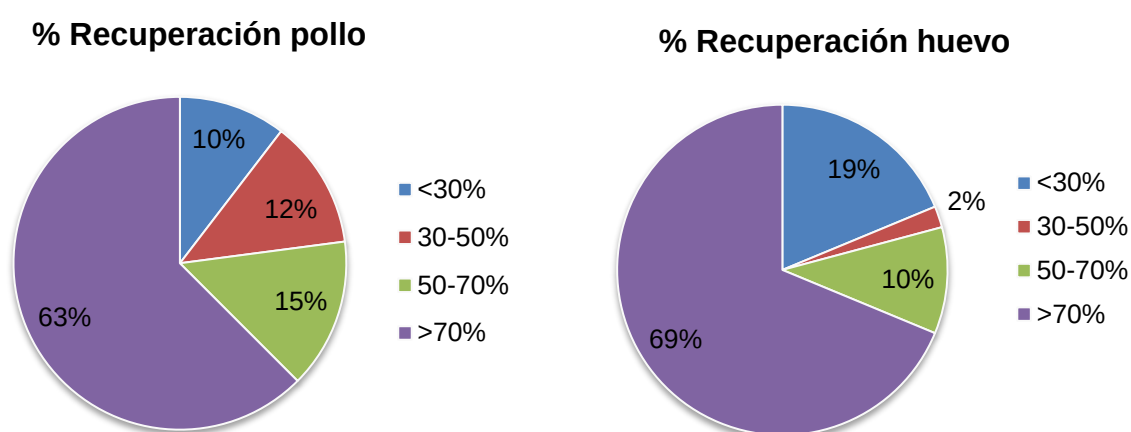


Figura 13. Evaluación del porcentaje de recuperación de los analitos estudiados en muestras fortificadas de pollo y huevo.

Un total de 5 compuestos de los que se analizaron en modo de ionización positivo presentaron una recuperación por debajo del 30% para el caso de la carne de pollo, subiendo este valor hasta 9 compuestos para el análisis en huevo. En el modo de ionización negativo, todos los compuestos presentaron un porcentaje de recuperación por encima del 40% en las muestras de pollo y superior al 50% en las de huevo.

Atendiendo al tipo de compuesto analizado es posible observar claras diferencias en cuanto a la recuperación. De manera general, se observaron mejores porcentajes de recuperación en pesticidas que en productos veterinarios, recuperándose la mayoría de los pesticidas estudiados (74%) en un rango entre 60-120%. En el caso de los fármacos, los resultados obtenidos van a estar condicionados por las características fisicoquímicas de cada uno de ellos. Un ejemplo de ello se puede ver en el caso de lincomycin, para el que la recuperación es baja en las dos matrices evaluadas, probablemente porque su polaridad ($\log P_{ow}=0.56$) limita su extracción en acetonitrilo. Bajos porcentajes de recuperación se obtuvieron para antibióticos pertenecientes a las familias de las tetraciclinas y fluoroquinolonas (chlortetracycline, danofloxacin, difloxacin, enrofloxacin) a pesar de la adición de EDTA durante el protocolo de extracción ya que, como se comentaba anteriormente, éstos compuestos tienden a complejarse con los diferentes cationes divalentes presentes en el medio. Hay estudios que demuestran la eficacia del EDTA como agente quelante, obteniéndose buenas recuperaciones para estas familias de compuestos tanto en huevo (Alcántara-Durán *et al.*, 2018) como en carne de pollo (Cao *et al.*, 2018). Es por ello por lo que se justifica en la propuesta inicial el empleo de EDTA entre las sales de extracción para posibilitar la recuperación de compuestos como tetraciclinas, macrólidos, quinolonas. No obstante, los resultados obtenidos indican la necesidad de optimizar el uso de esta sal en el método propuesto para futuras aplicaciones.

5.4. Aplicación del método a muestras reales

Con objeto de evaluar la aplicabilidad del método desarrollado se analizaron 3 muestras de huevo y otras 3 de carne de pollo, las cuales fueron adquiridas de marcas diferentes. Para la identificación y confirmación de los diferentes compuestos se siguieron los criterios fijados en la Decisión de la Comisión 2002/657/EC y la Guía SANTE/12682/2019. En todos los casos, los positivos detectados fueron confirmados con una tolerancia del tiempo de retención de ± 0.1 min respecto al estándar de calibrado y con una exactitud de masa inferior a 5 ppm.

Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 10 y 11. Para el caso del huevo, hubo algunas muestras en las que se obtuvieron señales de varios compuestos cuyo uso no está autorizado en la Unión Europea (danofloxacin, sarafloxacin, difloxacin, enrofloxacin, sulfadimethoxine, sulfaquinoxaline). La presencia de estas sustancias no se pudo confirmar ya que no se obtuvo información adicional sobre sus iones fragmento. La aplicación de otra técnica analítica como MS/MS, que permite la fragmentación de las moléculas de analito, sería necesaria para confirmar su presencia en la muestra de manera inequívoca.

Tabla 10. Concentración de analitos ($\mu\text{g L}^{-1}$) detectados en muestras comerciales de pollo. El resto de compuestos que no aparecen en la tabla no fueron detectados.

Compuestos	Pollo		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Chlortetracycline	3.04	ND	ND
Trimethoprim	0.09	ND	ND
Fenbendazole	0.34	0.33	0.29
Sulfadimethoxine	3.31	3.90	ND
Sulfaquinoxaline	ND	2.27	ND
Difenoconazole	0.95	0.72	0.66
Paclobutrazol	0.48	0.29	ND
Piperonyl Butoxide	ND	ND	<0.24
Metconazole	ND	ND	1.04
Nicarbazine	ND	4.72	ND
Fipronil	<0.07	ND	ND

ND: No detectado

Tabla 11. Concentración de analitos ($\mu\text{g L}^{-1}$) detectados en muestras comerciales de huevo. El resto de compuestos que no aparecen en la tabla no fueron detectados.

Compuestos	Huevo		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Chlortetracycline	11.12	5.80	3.40
Danofloxacin*	0.73	ND	ND
Sarafloxacin*	1.18	0.49	ND
Difloxacin*	0.70	ND	ND
Fenbendazole	0.68	0.33	ND
Enrofloxacin*	0.67	<0.20	0.23
Sulfadimethoxine*	3.79	4.36	ND
Sulfaquinoxaline*	4.23	5.12	3.18
Difenoconazole	0.53	0.55	0.29
Paclobutrazol	0.25	0.36	0.34
Piperonyl Butoxide	<0.49	0.51	ND
Metconazole	0.90	0.57	ND
Nicarbazine	ND	0.29	ND

ND: No detectado

(*) Necesidad de confirmación por otra técnica analítica

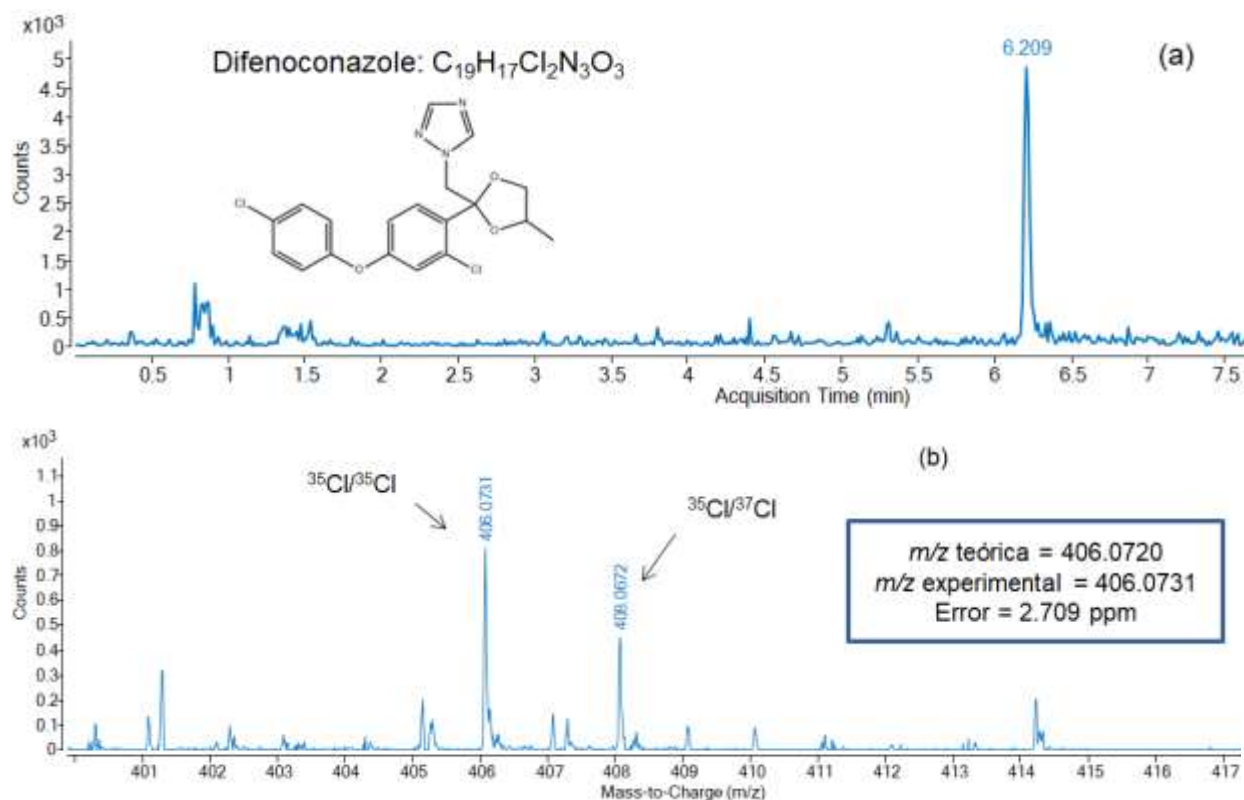


Figura 14. Detección y confirmación de la presencia del pesticida difenoconazole en una muestra de pollo. (a) EIC de difenoconazole a partir de la relación m/z exacta de la molécula protonada ($[\text{M}+\text{H}]^+$). (b) Espectro de masas y perfil isotópico de cloro.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que todos los analitos detectados se encuentran por debajo del límite máximo establecido por la legislación, de modo que no existiría ningún riesgo para el consumidor. A modo de ejemplo, en la Figura 14 se muestra la detección y confirmación del pesticida difenoconazole en una de las muestras de pollo. La presencia de este pesticida ha sido detectada en todas las muestras analizadas.

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha desarrollado un método para la detección y cuantificación de contaminantes orgánicos en huevo y en carne de pollo. Un total de 48 pesticidas y productos veterinarios, incluyendo varios de diferentes familias, han sido analizados de manera rápida y eficaz. Para ello se ha propuesto un análisis basado en el empleo del método QuEChERS como etapa de tratamiento de muestra, haciendo uso de sales de citrato y EDTA durante la extracción con disolventes y utilizando EMR-Lipid como sorbente en la fase de purificación. La detección se ha llevado a cabo mediante LC-TOFMS en modo de ionización positivo y negativo, permitiendo una identificación inequívoca de los compuestos estudiados mediante medidas de masa exacta, además de la información proporcionada por el tiempo de retención, fragmentación y patrones isotópicos. Los resultados obtenidos demuestran la alta sensibilidad del método propuesto ya que todos los LOQs calculados son inferiores a $10 \mu\text{g L}^{-1}$, estando todos por ellos por debajo de los LMRs que establece la legislación para estos compuestos. Con respecto al estudio de recuperación, los resultados mostraron recuperaciones adecuadas para buena parte de los compuestos analizados. No obstante, bajas recuperaciones se obtuvieron para determinadas familias de compuestos (tetraciclinas y fluoroquinolonas), siendo la recuperación de estas sustancias una de las variables a optimizar para posteriores aplicaciones. El método propuesto fue aplicado a muestras reales de huevo y carne de pollo. Un total de 11 compuestos fueron detectados en las diferentes muestras, si bien todos ellos se encontraban por debajo de límite máximo que recoge la normativa.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AESAN. Agencia Española De Seguridad Alimentaria Y Nutrición. Disponible en línea: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/home/aecosan_inicio.htm
- Agilent Technologies. (2016). *The LC handbook: Guide to LC Columns and Method Development*. Disponible en línea: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/LC-Handbook-Complete-2.pdf>
- Akgün, B., Hamzaoğlu, M., Tosunoğlu, H., Demir, S., Deniz, A., & Zengingönül Gökçay, R. (2020). A survey of 59 pesticide residues in Turkish chicken eggs using LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 1–8.
- Alcántara-Durán, J., Moreno-González, D., Gilbert-López, B., Molina-Díaz, A., & García-Reyes, J. F. (2018). Matrix-effect free multi-residue analysis of veterinary drugs in food samples of animal origin by nanoflow liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *Food Chemistry*, 245, 29–38.
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International*, 86, 412–431.
- Aulakh, R. S., Gill, J. P. S., Bedi, J. S., Sharma, J. K., Joia, B. S., & Ockerman, H. W. (2006). Organochlorine pesticide residues in poultry feed, chicken muscle and eggs at a poultry farm in Punjab, India. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 741–744.
- Azzouz, A., & Ballesteros, E. (2015). Multiresidue method for the determination of pharmacologically active substances in egg and honey using a continuous solid-phase extraction system and gas chromatography–mass spectrometry, *Food Chemistry*, 178, 63–69.
- Beyer, A., & Biziuk, M. (2008). Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. *Food Chemistry*, 108, 669–680.
- Boulanouar, S., Combès, A., Mezzache, S., & Pichon, V. (2018). Synthesis and application of molecularly imprinted silica for the selective extraction of some polar organophosphorus pesticides from almond oil. *Analytica Chimica Acta*, 1018, 35–44.

- Calatayud-Vernich, P., Calatayud, F., Simó, E., & Picó, Y. (2016). *Efficiency of QuEChERS approach for determining 52 pesticide residues in honey and honey bees. MethodsX*, 3, 452–458.
- Cao, G., Zhan, J., Shi, X., Deng, X., Zhu, J., Wu, W., & Chen, X. (2018). *Analysis of 140 Veterinary Drugs and Other Contaminants in Poultry Muscle by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Chromatographia*, 81, 707–718.
- Chen, D., Yu, J., Tao, Y., Pan, Y., Xie, S., Huang, L., Peng, D., Wang, X., Wang, Y., Liu, Z., & Yuan, Z. (2016). *Qualitative screening of veterinary anti-microbial agents in tissues, milk, and eggs of food-producing animals using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B*, 1017-1018, 82–88.
- Chen, Q., Pan, X.-D., Huang, B.-F., & Han, J.-L. (2017). *Quantification of 16 β -lactams in chicken muscle by QuEChERS extraction and UPLC-Q-Orbitrap-MS with parallel reaction monitoring. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 145, 525–530.
- Chiao Chan, C., Koesukwiwat, U., Yudthavorasit, S., & Leepipatpiboon, N. (2010). *Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle. Analytica Chimica Acta*, 682, 117–129.
- Chico, J., Rúbies, A., Centrich, F., Companyó, R., Prat, M. D., & Granados, M. (2008). *High-throughput multiclass method for antibiotic residue analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A*, 1213, 189–199.
- Choi, S., Kim, S., Shin, J. Y., Kim, M., & Kim, J.-H. (2015). *Development and verification for analysis of pesticides in eggs and egg products using QuEChERS and LC–MS/MS. Food Chemistry*, 173, 1236–1242.
- Codex Alimentarius, FAO-WHO. *Base de datos en línea del Codex. Disponible en línea: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/es/>*
- Cole, M. B., Augustin, M. A., Robertson, M. J., & Manners, J. M. (2018). *The science of food security. Nature Partner Journals, Science of Food*, 2,14.
- CSA. (2012). *Comité de Seguridad Alimentaria Mundial. En buenos términos con la terminología: Seguridad alimentaria. Seguridad nutricional. Seguridad*

alimentaria y nutrición. Seguridad alimentaria y nutricional. 39º periodo de sesiones, Roma. Disponible en línea: <http://www.fao.org/3/MD776s/MD776s.pdf>

- CSA. (2017). Comité de Seguridad Alimentaria Mundial. Marco estratégico mundial para la seguridad alimentaria y la nutrición (MEM). Disponible en línea: <http://www.fao.org/3/MR173ES/mr173es.pdf>
- Decisión de la Comisión 2002/657/EC, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados.
- Deng, X.-J., Yang, H.-Q., Li, J.-Z., Song, Y., Guo, D.-H., Luo, Y., Du, N.-X., & Bo, T. (2011). Multiclass residues screening of 105 veterinary drugs in meat, milk, and eggs using ultra high performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 34, 2286-2303.
- Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de 2001, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios.
- Directiva 96/23/CE del Consejo, de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos.
- EFSA. European Food Safety Authority. Disponible en línea: <https://www.efsa.europa.eu/>
- Etienne, J., Chirico, S., McEntaggart, K., Papoutsis, S., & Millstone, E. (2018). *EU Insights – Consumer perceptions of emerging risks in the food chain*. EFSA Supporting publication 2018:EN-1394, 1-81.
- EU Pesticides database. Disponible en línea: https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-db_en
- European committee for standardization (2008). *Foods of plant origin—determination of pesticide residues using GC-MS and/ or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dispersive SPE—QuEChERS-method*; EN 15662.
- FAO & WHO. (2014). *The International Code of Conduct on Pesticide Management*. Disponible en línea: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Code/CODE_2014Sep_ENG.pdf

- FAO. (1996). *Declaración de Roma sobre la Seguridad Alimentaria Mundial y Plan de Acción de la Cumbre Mundial de la Alimentación*. Disponible en línea: <http://www.fao.org/DOCREP/003/W3613S/W3613S00.HTM>
- FAO. (2013). *Revisión Del Desarrollo Avícola*. Disponible en línea: <http://www.fao.org/3/i3531s/i3531s00.htm>
- FAO. (2020). *Producción y productos avícolas*. Disponible en línea: <http://www.fao.org/poultry-production-products/products-and-processing/es/>
- Filazi, A., Yurdakok-Dikmen, B., Kuzukiran, O., & Sireli, U. T. (2017). *Chemical Contaminants in Poultry Meat and Products*. *Poultry Science*, 9, 172-190.
- Frenich, A. G., Plaza-Bolaños, P., Aguilera-Luiz, M. M., & Martínez-Vidal, J.L. (2009). *Chapter 1: Recent advances in the analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents by chromatography techniques*. In book: *Chromatography Types, Techniques and Methods*, pp 1-102. ISBN: 978-1-60876-316-0.
- Frenich, A. G., Romero-González, R., Gómez-Pérez, M. L., & Vidal, J. L. M. (2011). *Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 1218, 4349– 4356.
- Gómez-Pérez, M. L., Romero-González, R., Plaza-Bolaños, P., Génin, E., Martínez Vidal, J. L., & Garrido Frenich, A. (2014). *Wide-scope analysis of pesticide and veterinary drug residues in meat matrices by high resolution MS: detection and identification using Exactive-Orbitrap*. *Journal of Mass Spectrometry*, 49, 27–36.
- González-Curbelo, M. Á., Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A. V., González-Sálamo, J., Hernández-Borges, J., & Rodríguez-Delgado, M. Á. (2015). *Evolution and applications of the QuEChERS method*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 169–185.
- Guía SANTE/12682/2019. *Validación de métodos y procedimientos de control de calidad para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos*.
- Guo, Q., Zhao, S., Zhang, J., Qi, K., Du, Z., & Shao, B. (2018). *Determination of fipronil and its metabolites in chicken egg, muscle and cake by a modified QuEChERS method coupled with LC-MS/MS*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35, 1543–1552.

- Hassaan, M. A., & El Nemr, A. (2020). *Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46, 207-220.
- Hernández, F., Sancho, J. V., Ibáñez, M., Abad, E., Portolés, T., & Mattioli, L. (2012). *Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403, 1251–1264.
- Hird, S. J., Lau, B. P.-Y., Schuhmacher, R., & Krska, R. (2014). *Liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of chemical contaminants in food. TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 59, 59–72.
- Instituto de Estudios del Huevo (2020). *Disponible en línea: <https://www.institutohuevo.com/>*
- Kaufmann, A. (2011). *The current role of high-resolution mass spectrometry in food analysis. Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403, 1233–1249.
- Lambropoulou, D. A., & Albanis, T. A. (2007). *Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry-based techniques: a review. Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 1663–1683.
- Lehotay, S. J. (2007). *Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. Journal of AOAC International*, 90, 485–520.
- Lehotay, S. J., Son, K. A., Kwon, H., Koesukwiwat, U., Fu, W., Mastovska, K., Hoh, E., & Leepipatpiboon, N. (2010). *Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. Journal of Chromatography A*, 1217, 2548–2560.
- Lippold, R., Bäuerle, F., Müller, H., Juschenko, S., Walter, S., Radykewicz, T., Dambacher, B., & Harderbusch, B. (2015). *Pesticide residues in food of animal origin & commodities with the high fat content. News from EURL AO*.
- Liu, S., Zheng, Z., Wei, F., Ren, Y., Gui, W., Wu, H., & Zhu, G. (2010). *Simultaneous Determination of Seven Neonicotinoid Pesticide Residues in Food by Ultraperformance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3271–3278.
- Lopes, R. P., Reyes, R. C., Romero-González, R., Frenich, A. G., & Vidal, J. L. M. (2012). *Development and validation of a multiclass method for the determination*

of veterinary drug residues in chicken by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*, 89, 201–208.

- Lucci, P., Pacetti, D., Nunez, O., & Frega, N. G. (2012). Chapter 5: Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis. Chromatography. In book: *Chromatography – the Most Versatil Method of Chemical Analysis*, pp 127-164. ISBN: 978-953-51-0813-9.
- Luo, P., Liu, X., Kong, F., Chen, L., Wang, Q., Li, W., Wen, S., Tang, L., & Li, Y. (2019). Simultaneous determination of 169 veterinary drugs in chicken eggs with EMR-Lipid clean-up using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 11, 1657-1662.
- MAPA. (2020). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Caracterización del sector avícola de puesta. Disponible en línea: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/caracterizaciondelsectoravicoladepuesta2019_rev_tcm30-436298.pdf
- MAPA. (2020). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. El sector de la avicultura de carne en cifras: Principales Indicadores Económicos. Disponible en línea: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/caracterizaciondelsectoravicoladepuesta2019_rev_tcm30-436298.pdf
- Masiá, A., Suarez-Varela, M. M., Llopis-Gonzalez, A., & Picó, Y. (2016). Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review. *Analytica Chimica Acta*, 936, 40–61.
- Moreiras, T. O., Carbajal, A. A., Cabrera, F. L., & Cuadrado, C. (2018). *Tablas De Composición De Alimentos*. 19ª Edición. ISBN: 978-84-368-3947-0
- Negre, M., Passarella, I., Vindrola, D., & Baglieri, A. (2014). Determination of Forchlorfenuron in Fruits by Solid Phase or QuEChERS Extraction and LC-UV or LC/MS/MS. *Journal of AOAC International*, 97, 938–941.
- OCDE/FAO. (2019). *Perspectivas Agrícolas 2019-2028*, OCDE Publishing, París/Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Roma. Disponible en línea: https://read.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/ocde-fao-perspectivas-agricolas-2019-2028_7b2e8ba3-es
- OMS (2010). Organización Mundial de la Salud. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009. Disponible en línea: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44271>

- ONU (2015). *Agenda 2030: Objetivos de Desarrollo Sostenible*. Disponible en línea: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/>
- Ötles, S., & Kartal, C. (2016). *Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and applications in food samples*. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 15, 5–15.
- Parrilla Vázquez, P., Lozano, A., Ferrer, C., Martínez Bueno, M. J., & Fernández-Alba, A. R. (2018). *Improvements in identification and quantitation of pesticide residues in food by LC-QTOF using sequential mass window acquisition (SWATH®)*. *Analytical Methods*, 10, 2821–2833.
- Perestrelo, R., Silva, P., Porto-Figueira, P., Pereira, J. A. M., Silva, C., Medina, S., & Câmara, J. S. (2019). *QuEChERS -fundamentals, relevant improvements, applications and future trends*. *Analytica Chimica Acta*, 1070, 1-28.
- Pérez-Ortega, P., Lara-Ortega, F. J., García-Reyes, J. F., Gilbert-López, B., Trojanowicz, M., & Molina-Díaz, A. (2016). *A feasibility study of UHPLC-HRMS accurate-mass screening methods for multiclass testing of organic contaminants in food*. *Talanta*, 160, 704–712.
- Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal.
- Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.
- Reglamento (CE) N° 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo de 2009 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos (LMR) de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal.
- Reglamento (UE) N° 37/2010 de la Comisión, de 22 de diciembre de 2009, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal.
- Réhault-Godbert, S., Guyot, N., & Nys, Y. (2019). *The Golden Egg: Nutritional Value, Bioactivities, and Emerging Benefits for Human Health*. *Nutrients*, 11, 684.

- Ridgway, K., Lalljie, S. P. D., & Smith, R. M. (2007). *Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. Journal of Chromatography A*, 1153, 36–53.
- Sagratini, G., Fernandez-Franzon, M., De Berardinis, F., Font, G., Vittori, S., & Manes, J. (2012). *Simultaneous determination of eight underivatised biogenic amines in fish by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Chemistry*, 132, 537–543.
- Silano, M., & Silano, V. (2015). *Food and feed chemical contaminants in the European Union: Regulatory, scientific, and technical issues concerning chemical contaminants occurrence, risk assessment, and risk management in the European Union. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 2162–2217.
- Sivaperumal, P., Anand, P., & Riddhi, L. (2015). *Rapid determination of pesticide residues in fruits and vegetables, using ultra-high-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. Food Chemistry*, 168, 356–365.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2014). *Fundamentos de química analítica. 9ª Edición. ISBN: 978-0-495-55828-6.*
- Stahnke, H., Kittlaus, S., Kempe, G., & Alder, L. (2012). *Reduction of Matrix Effects in Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Mass Spectrometry by Dilution of the Sample Extracts: How Much Dilution is Needed? Analytical Chemistry*, 84, 1474–1482.
- USFDA. *United States Food and Drug Administration*. Disponible en línea: <https://www.fas.usda.gov/maximum-residue-limits-mrl-database>
- USITC. (2020). *United States International Trade Commission. Global Economic Impact of Missing and Low Pesticide Maximum Residue Levels, Volume 1, Investigation No. 332-573. Disponible en línea: https://www.usitc.gov/publications/332/pub5071.pdf.*
- Wilm, M. (2011). *Principles of Electrospray Ionization. Molecular & Cellular Proteomics*, 10, M111.009407.
- Xie, X., Wang, B., Pang, M., Zhao, X., Xie, K., Zhang, Y., Wang, Y., Guo, Y., Liu, C., Bu, X., Wang, R., Shi, H., Zhang, G., Zhang, T., Dai, G., & Wang, J. (2018). *Quantitative analysis of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in eggs via liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. Food Chemistry*, 269, 542–548.

- Yadav, I. S., & Devi, N. L. (2017). *Chapter 7: Pesticides Classification and its Impact on Human and Environment. In book: Environment Science and Engineering, pp 140-158. ISBN: 1626990948.*
- Yang, P., Chang, J. S., Wong, J. W., Zhang, K., Krynitsky, A. J., Bromirski, M., & Wang, J. (2015). *Effect of Sample Dilution on Matrix Effects in Pesticide Analysis of Several Matrices by Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63, 5169–5177.*
- Zhang, M., Li, E., Su, Y., Zhang, Y., Xie, J., & He, L. (2018). *Quick Multi-Class Determination of Residues of Antimicrobial Veterinary Drugs in Animal Muscle by LC-MS/MS. Molecules, 23, 1736.*
- Zhang, X., Song, Y., Jia, Q., Zhang, L., Zhang, W., Mu, P., Jia, Y., Qian, Y., & Qiu, J. (2019). *Simultaneous determination of 58 pesticides and relevant metabolites in eggs with a multi-functional filter by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass Journal of Chromatography A, 1593, 81–90.*
- Zhang, Y., Li, X., Liu, X., Zhang, J., Cao, Y., Shi, Z., & Sun, H. (2015). *Multiclass, multi-residue analysis of trace veterinary drugs in milk by rapid screening and quantification using ultra-performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Journal of Dairy Science, 98, 8433–8444.*

8. ANEXOS

8.1. Abreviaturas

Ac	Acetato
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
AOAC	<i>Association of Official Analytical Collaboration</i>
API	Ionización a presión atmosférica (<i>Atmospheric pressure ionization</i>)
BPA	Buenas Prácticas Agrícolas
CMA	Cumbre Mundial de la Alimentación
DMSO	Dimetilsulfóxido
d-SPE	Extracción en fase sólida dispersiva (<i>Dispersive solid phase extraction</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (<i>European Food Safety Authority</i>)
EIC	Cromatograma de ion extraído (<i>Extracted Ion Chromatogram</i>)
EMR-Lipid	<i>Enhanced Matrix Removal-Lipid</i>
ESI	Electrospray
EURL AO	Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para Residuos de Pesticidas en Alimentos de Origen Animal (<i>European Union Reference Laboratory for Pesticide Residues in Foods of Animal Origin</i>)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (<i>Food and Agriculture Organization</i>)
GCB	Carbón grafitizado (<i>Graphitized carbon black</i>)
HLB	Balance hidrofílico-lipofílico (<i>Hidrophilic lipophilic balanced</i>)
UAE	Extracción asistida por ultrasonidos (<i>Ultrasound assisted extraction</i>)
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia (<i>High performance liquid chromatography</i>)

HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución (<i>High resolution mass spectrometry</i>)
INFOSAN	Red Internacional de Autoridades de Inocuidad de los Alimentos (<i>International Food Safety Authorities Network</i>)
IT	Trampa de iones (<i>Ion trap</i>)
LC	Cromatografía líquida (<i>Liquid chromatography</i>)
LDR	Rango dinámico lineal (<i>Linear dynamic range</i>)
LLE	Extracción líquido-líquido (<i>Liquid-liquid extraction</i>)
LMR	Límite Máximo de Residuo
LOQ	Límite de cuantificación (<i>Limit of quantification</i>)
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
MS	Espectrometría de masas (<i>Mass spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometría de masas en tandem
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de las Naciones Unidas
PES	Poliéter sulfona
PSA	Amina primaria-secundaria (<i>Primary-secondary amine</i>)
PTFE	Politetrafluoroetileno
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
Q	Cuadrupolo (<i>Quadrupole</i>)
QQQ	Triple cuadrupolo (<i>Triple quadrupole</i>)
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe</i>
RASFF	Sistema de Alerta Rápido para Alimentos y Piensos (<i>Rapid Alert System for Food and Feed</i>)
RSD	Desviación estándar relativa (<i>Relative standard deviation</i>)
S/N	Relación señal-ruido (<i>Signal-to-noise ratio</i>)
SCIRI	Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información
SGA	Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos
SLE	Extracción sólido-líquido (<i>Solid-liquid extraction</i>)

SPE	Extracción en fase sólida (<i>Solid phase extraction</i>)
TIC	Cromatograma de iones totales (<i>Total ion chromatogram</i>)
TOF	Tiempo de vuelo (<i>Time of flight</i>)
UE	Unión Europea
UHPLC	Cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia (<i>Ultra high performance liquid chromatography</i>)
USFDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (<i>United States Food and Drug Administration</i>)