



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

**"MÉTODOS DE ANÁLISIS Y
OCURRENCIA DE PERCLORATO Y
OTROS CONTAMINANTES
POLARES EN ALIMENTOS DE
ORIGEN VEGETAL"**

Alumno/a: Ruiz Peláez, Clara

Tutor/a: Bienvenida Gilbert López

Marcos Bouza Areces

Dpto: Química Física y Analítica

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. OBJETIVOS	4
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1. Aspectos generales	6
3.2. Ocurrencia y exposición del perclorato en la Unión Europea	7
3.3. Riesgos asociados al consumo de alimentos contaminados por perclorato.....	9
3.4. Evaluación y gestión del riesgo de la presencia de perclorato en alimentos	10
4. BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE LA BIBLIOGRAFÍA	13
5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL PERCLORATO Y OTROS CONTAMINANTES POLARES	18
5.1. Tratamiento de muestras	18
5.1.1. Extracción QuEChERS	22
5.1.2. Extracción QuPPE – PO	25
5.2. Cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)	28
5.3. Cromatografía iónica combinada con espectrometría de masas en tándem (IC-MS/MS)	35
6. PROPUESTA DE UN MÉTODO Y JUSTIFICACIÓN	38
7. CONCLUSIONES	41
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
9. ANEXO DE ABREVIATURAS	49

1. RESUMEN

La presencia de perclorato en los alimentos, generalmente de origen vegetal, ha originado en los últimos años una serie de alarmas relacionadas con los efectos nocivos en la salud a consecuencia del consumo de dichos alimentos contaminados. Esto ha propiciado que la Unión Europea establezca una nueva normativa para evitar que estos problemas continúen. Durante los últimos años se han descrito diversos métodos para la determinación de perclorato y otros contaminantes polares en diferentes muestras de alimentos. La necesidad de nuevas estrategias ha hecho que métodos de preparación de muestra genéricos como QuEChERS y QuPPE-PO hayan sido optimizados, siendo tanto la cromatografía líquida como la cromatografía iónica -ambas combinadas con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS y IC-MS/MS) los métodos de determinación y cuantificación de percloratos más consolidados y efectivos. Este trabajo se centrará en el estudio detallado de estas técnicas, además de proporcionar información acerca de la presencia de este contaminante y la normativa aplicada al respecto.

ABSTRACT

The presence of perchlorate in food, typically from vegetal nature, has raised a series of concerns about the potential harmful effects of perchlorate-contaminated foods on the human health. The European Union has established new regulations to prevent future health issues associated with this contaminant. Research efforts have been devoted to establishing novel approaches for the determination of perchlorate and related polar contaminants in the last decade. Amongst them, both QuEChERS and QuPPE-PO are probably the more suited sample treatment approaches, combined with either liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) or ion chromatography/tandem mass spectrometry (IC-MS/MS). The present work has focused on the detailed bibliographic review on the mentioned techniques, the impact and the current implemented regulations to tackle this contaminant.

2. OBJETIVOS

Objetivo General: Evaluar la influencia del perclorato y otros contaminantes polares junto a sus métodos de determinación en alimentos de origen vegetal.

Objetivos Específicos:

- Analizar la presencia de perclorato en los alimentos y la exposición de la población a dicho contaminante.
- Evaluar los riesgos ocasionados por el perclorato así como la gestión de los mismos.
- Exponer los métodos más utilizados para el tratamiento de muestras de alimentos de origen vegetal para la determinación de perclorato y contaminantes polares.
- Examinar las técnicas cromatográficas de mayor importancia para la detección de perclorato y diferentes compuestos polares en vegetales.

3. INTRODUCCIÓN

Con el paso de los años, el uso en la agricultura de contaminantes químicos como los plaguicidas, se ha visto notablemente incrementado (ver Figura 1), como consecuencia de la búsqueda de un mayor rendimiento, un aumento de la calidad de los productos en materia de inocuidad alimentaria, y la prolongación de la vida útil de los cultivos.



Figura 1. Uso de plaguicidas totales a nivel mundial 2000-2018. (FAOSTAT, 2021).

Dicho incremento, también puede ser debido al constante aumento de la población y el consecuente aumento del consumo, siendo Europa, como indica el gráfico de la Figura 2, el tercer continente con mayor uso de contaminantes químicos como los plaguicidas. Este hecho, contribuye a la contaminación del medio ambiente y de los cultivos, siendo considerado un riesgo para la salud (Narendran, *et al.*, 2020).

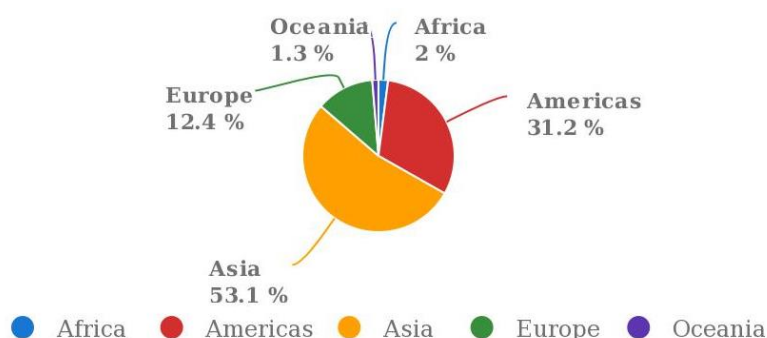


Figura 2. Uso de plaguicidas totales por continente 2000-2018. (FAOSTAT, 2021).

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, EFSA (European Food Safety Authority) define a los contaminantes químicos como: “Sustancias químicas que no se han añadido intencionalmente a alimentos o piensos”. Uno de estos contaminantes es el perclorato, al que se le atribuye el concepto de “contaminante emergente o silencioso”,

debido a que su impacto en el medio no ocurre de forma directa, sino que su persistencia en el agua debido a sus características fisicoquímicas es lo que conferirá a este compuesto la capacidad de permanecer como residuo contaminante en diferentes grupos de alimentos.

Son numerosos los estudios relacionados con la aparición de perclorato en distintas muestras de alimentos. Se ha comprobado que la ingesta de estos presenta un elevado riesgo para la salud de los consumidores. La presencia de este compuesto contaminante en el organismo provoca efectos perjudiciales sobre el desarrollo tiroideo, hormonal y neuronal, especialmente en lactantes y fetos (Calderón, *et al.*, 2017).

Es por ello por lo que cada vez en mayor medida, se persigue la máxima seguridad y calidad de los alimentos en el mercado, siendo esta una de las competencias en materia alimentaria de los gobiernos, y una necesidad por parte de los productores y los consumidores.

3.1. Aspectos generales

El perclorato (ClO_4^-) es un ion cargado negativamente, compuesto por un átomo de cloro rodeado por cuatro átomos de oxígeno dispuestos en posición tetraédrica (ver Tabla 1). Presenta gran estabilidad en el agua, pues las sales presentes en su composición son muy solubles en ésta. Dicho anión se puede formar en la atmósfera, encontrándose en el medio de forma natural, siendo su escasa tendencia a adsorberse en superficies minerales u orgánicas, lo que hace que, tras su precipitación en el suelo, persista en las aguas superficiales o subterráneas, a través de las cuales entra en contacto con los alimentos.

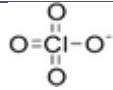
También, el perclorato es un componente de muchas pirotecnias y, como tal, la fabricación, el almacenamiento, la manipulación, el uso y la eliminación de estos productos potencian la introducción de perclorato como contaminante en el medio ambiente, aumentando los impactos de éste en el agua (Gu, *et al.*, 2006).

La utilización de fertilizantes agrícolas con alto contenido en perclorato favorece la acumulación de este contaminante en los alimentos. De igual modo, el proceso de degradación de la lejía (NaClO) utilizada en la desinfección de aguas y el uso de otros

productos de limpieza clorados en las industrias alimentarias, deriva en la formación de este ion como contaminante.

De todas estas fuentes, la contaminación del suelo, del agua utilizada para el riego, y de los fertilizantes son las más comunes en la contaminación de alimentos de origen vegetal por perclorato (AESAN, 2020a).

Tabla 1. Características químicas del perclorato. (Steinmaus, 2019).

Fórmula química	ClO_4^-
Estructura química	
Número CAS	14797-73-0
Peso molecular	99,45 g / mol
Forma física	Polvo cristalino blanco o líquido transparente
Formas químicas comunes	Perclorato de amonio (NH_4ClO_4), perclorato de sodio (NaClO_4), perclorato de potasio (KClO_4) y ácido perclórico (HClO_4)

3.2. Ocurrencia y exposición del perclorato en la Unión Europea

Debido a su alta solubilidad y movilidad, el perclorato sigue el flujo del agua dentro de la planta y tiende a acumularse más en las hojas de los vegetales (donde se da la transpiración) que en el fruto. Por ejemplo, se encontró que las concentraciones de perclorato en las hojas de soja cultivadas en invernadero son significativamente más altas que en las semillas de soja, y las concentraciones en las hojas de tomate también son más altas que en el fruto (Gu, *et al.*, 2006).

Según la EFSA (2017), como se observa en la Figura 3, los valores medios de perclorato más elevados se encuentran en alimentos vegetales de hoja verde (frescos) como la espinaca (132 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y la rúcula (75 $\mu\text{g}/\text{kg}$), algunas hortalizas frescas como el rábano (117 $\mu\text{g}/\text{kg}$), y también en otros productos secos de origen vegetal como el té y otras infusiones en su estado sólido (324 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y algunas hierbas, condimentos y especias (63 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

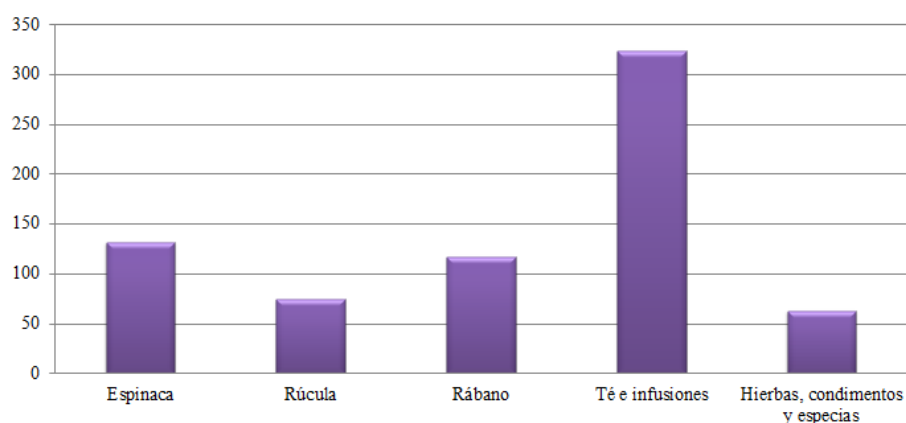


Figura 3. Valores medios de perclorato en algunos alimentos. (EFSA, 2017).

También cabe destacar que, además de ser los vegetales y sus derivados uno de los grupos de alimentos con mayor contenido en perclorato, la leche y productos lácteos, así como las frutas y sus derivados, contribuyen a la exposición en todos los grupos de población de forma importante. Por otra parte, tendrán mayor peso en grupos concretos de población productos como los alimentos para bebés y niños pequeños y los zumos de frutas (EFSA, 2014).

La exposición de la población al perclorato a través de estos tipos de alimentos ha sido evaluada por la Comisión Técnica de Contaminantes de la Cadena Alimentaria (CONTAM) de la EFSA, ya que se ha demostrado que la presencia de este contaminante en el organismo inhibe la absorción del yodo y como consecuencia, disminuye la producción de la hormona T4 originada en el tiroides, cuya deficiencia a largo plazo provoca deterioro neurológico (Maffini, *et al.*, 2016). Por tanto, la exposición alimentaria crónica será de mayor relevancia en aquellas personas con déficit medio o moderado de yodo. Además, como se observa en la Tabla 2, la exposición dietética crónica media es mayor en niños (0-10 años) que en otros grupos de población más adulta (EFSA, 2017).

Tabla 2. Ingestas estimadas de percloratos en Europa a través de los alimentos. (EFSA, 2017).

Grupo de población	Ingesta media diaria ($\mu\text{g}/\text{kg p.c. día}$)
Lactantes (0-1 año)	0,04 – 0,61
Niños pequeños (1-3 años)	0,08 – 0,54
Niños mayores (4-10 años)	0,06 – 0,42
Adolescentes (11-18 años)	0,04 – 0,19
Adultos (19-65 años)	0,04 – 0,19
Personas mayores (> 65 años)	0,04 – 0,19

La CONTAM también evaluó la exposición a corto plazo (2-3 semanas) a valores significativamente elevados de perclorato, como consecuencia de los efectos adversos relacionados con la inhibición de la captación de yodo tiroideo, que podrían darse en grupos vulnerables como los lactantes y niños pequeños con baja ingesta de yodo, siendo el rango en las encuestas dietéticas el siguiente:

- Lactantes de 0,4 a 2,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por día.
- Niños pequeños, el rango de 0,62 a 2,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por día.
- Otros niños, de 0,41 a 1,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por día.
- El rango en las clases de adolescentes y adultos es en general de 0,26 a 1,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por día.

Al igual que ocurre con la exposición crónica, la exposición dietética media a corto plazo al perclorato es mayor para los niños que para los demás grupos de población (EFSA, 2014).

3.3. Riesgos asociados al consumo de alimentos contaminados por perclorato

La principal vía de entrada del perclorato en el cuerpo humano es mediante la ingesta de alimentos contaminados, incluida el agua. Es por ello, por lo que la exposición humana a este contaminante es generalizada, haciendo que toda la población se encuentre en riesgo.

En el momento en el que se consumen los alimentos contaminados con perclorato, éste es fácilmente absorbido en el organismo, sin apenas ser metabolizado, excretándose a través de la orina sin ningún cambio. La leche materna también se considera fuente de excreción de perclorato, y por tanto, también de exposición para lactantes, siendo estos, como se indica, uno de los fundamentales grupos de riesgo (Steinmaus, 2016).

Uno de los principales efectos que presenta la ingesta de dicho contaminante, es la afectación a la función tiroidea, ya que éste actúa inhibiendo de forma competitiva la captación de yodo, haciendo de esta forma, que la glándula disminuya la producción de hormonas tiroideas (Leoterio, *et al.*, 2017). Como consecuencia de ello, mujeres embarazadas, fetos, bebés y personas con afectaciones de la tiroides o carencia de yodo, se encuentran especialmente en riesgo de exposición al perclorato (Dong, *et al.*, 2019).

La inhibición del funcionamiento de la tiroides por el perclorato se lleva a cabo por la competición de éste con el simportador de yoduro de sodio (NIS), una proteína presente en la membrana plasmática encargada de captar el yoduro en las células encargadas de la producción de hormonas en la tiroides. Como se observa en la Figura 4, el perclorato inhibe el funcionamiento del NIS, dificultando así la producción de tiroxina (T4) y triyodotironina (T3), haciendo que se dé una liberación de hormona estimulante de la tiroides (TSH) por la glándula pituitaria (Maffini, et al., 2016; Steinmaus, 2016).

Esta disfunción en la glándula tiroidea, provoca hipotiroidismo y sintomatología clínica como fatiga, debilidad muscular, sensibilidad al frío, estreñimiento, aumento de peso, depresión y deterioro de la memoria en adultos, así como hipotiroidismo congénito y alteraciones en el desarrollo neurológico de fetos y niños como consecuencia de una deficiencia de yodo durante el periodo gestacional (Wang, *et al.*, 2020).

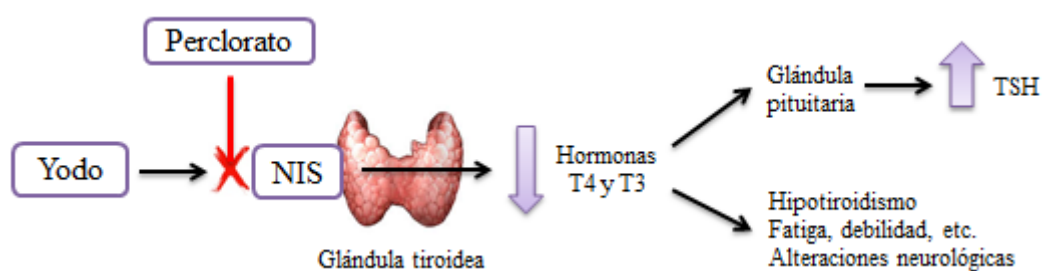


Figura 4. Inhibición del NIS por el perclorato.

Dichas afecciones neurológicas se pueden manifestar como carencias intelectuales, deficiencias de aprendizaje y problemas en el comportamiento. Es por ello, por lo que las estrategias de mitigación elaboradas para disminuir la exposición al perclorato y promover un aumento del consumo de yodo en la dieta, se han de considerar una de las prioridades en términos de salud pública (Maffini, et al., 2016).

3.4. Evaluación y gestión del riesgo de la presencia de perclorato en alimentos

La incertidumbre acerca de la aparición del perclorato en determinados alimentos, y sus efectos sobre la salud de los consumidores, dio lugar en septiembre de 2014 a que la EFSA creara el “Dictamen Científico sobre los riesgos para la salud pública relacionados con la presencia de perclorato en los alimentos, en particular frutas y

verduras”. En este dictamen, basándose en la disfunción de la absorción del yodo por la tiroides, se estableció una ingesta diaria tolerable (IDT) de 0,3 µg/kg de peso corporal.

Para la exposición aguda no se ha establecido dosis de referencia, ya que como se ha visto, a excepción de los niños, la exposición crónica al perclorato es la causante de la aparición de los efectos negativos en la salud.

En 2015 se establecieron por primera vez, en la “Declaración del Comité Permanente sobre perclorato en alimentos”, unos niveles de referencia de concentración de perclorato en alimentos para el comercio dentro de la Unión Europea. Actualmente, con la aprobación del *Reglamento (UE) 2020/685 de la Comisión de 20 de mayo de 2020 que modifica el Reglamento (CE) n° 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de perclorato en determinados alimentos*, los niveles de perclorato permitidos en alimentos son los que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Niveles máximos de perclorato permitidos en alimentos en la Unión Europea. (Reglamento (UE) 2020/658).

Productos alimenticios	Contenido máximo (mg/kg)
Frutas y hortalizas	0,05
<i>Cucurbitaceae</i> y col rizada	0,10
Hortalizas de hoja y hierbas	0,50
Té (<i>Camellia sinensis</i>) seco, infusiones de hierbas y frutas desecadas	0,75
Preparados y alimentos para usos médicos especiales destinados a lactantes y niños de corta edad.	0,01
Alimentos infantiles	0,02
Alimentos a base de cereales	0,01

Tras la aprobación de la Declaración del Comité Permanente, con la finalidad de disminuir al máximo las posibles dudas acerca de la evaluación del riesgo del perclorato, y teniendo en cuenta las publicaciones anteriores de la CONTAM de la EFSA sobre los riesgos ocasionados en la salud de los consumidores, la Comisión Europea redactó la *Recomendación 2015/682 para el seguimiento de la presencia de perclorato en los alimentos*, según la cual, los Estados Miembros, deberán prestar un control más exhaustivo respecto al contenido de perclorato en los siguientes alimentos:

- Frutas, hortalizas y sus derivados, incluyendo los zumos.
- Alimentos para lactantes y niños (1-3 años) reflejados en el **Reglamento (UE) n° 609/2013**.
- Hierbas desecadas, especias, té, infusiones de hierbas y de frutas.
- Bebidas, incluyendo el agua potable.

En el punto 3 de dicha Recomendación, se propone un método de análisis de perclorato en alimentos, denominado “Método rápido para el análisis de residuos de numerosos plaguicidas de gran polaridad” (*QuPPE*, por sus siglas en inglés), basado en una extracción simultánea con metanol seguido de la determinación mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS por sus siglas en inglés). Como se verá más adelante, éste es uno de los métodos más utilizados actualmente para el análisis de plaguicidas polares en los alimentos de origen vegetal, como el perclorato, ya que se trata de un método rápido que proporciona resultados fiables (Chamkasem, 2018; Hepperle, et al., 2013; Gormez, et al., 2021).

También se fijan los límites de cuantificación a la hora de analizar el contenido de perclorato en los alimentos, los cuales no deben ser superiores a los valores indicados en la Tabla 4.

Tabla 4. Límites de cuantificación para la determinación de perclorato en alimentos. (Recomendación (UE) 2015/682).

Alimentos destinados a niños y lactantes	2 µg/kg
Otros alimentos	10 µg/kg
Hierbas desecadas, especias, té e infusiones de hierbas y de frutas	20 µg/kg

Según la Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, una vez que el perclorato entra en contacto con los vegetales y es asimilado por estos, no puede ser eliminado, quedando por tanto acumulado en los alimentos. Solamente, se podrá reducir la presencia del mismo, disminuyendo la utilización de fertilizantes agrícolas con contenido en perclorato en los cultivos, lo que se traduce en un menor vertido de este contaminante al suelo y al agua. Si bien la presencia de perclorato en los alimentos como consecuencia del uso de productos desinfectantes en las industrias agroalimentarias se da de una forma más superficial, se puede llevar a cabo la eliminación del perclorato mediante un lavado correcto de los vegetales. Es por ello que

la aplicación de buenas prácticas de higiene y un sistema de análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC) en dichas industrias, son unas de las medidas necesarias para la prevención y/o reducción de contaminantes en los alimentos.

A nivel doméstico, también es de gran importancia la implantación de buenas prácticas, siendo una de las recomendaciones más indicadas para la eliminación del perclorato, al igual que a nivel industrial, un buen lavado de las frutas y verduras con agua potable y corriente (Elika, 2021).

4. BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE LA BIBLIOGRAFÍA

Para la realización de este trabajo, se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica, con el fin de extraer la máxima información acerca de los diferentes procesos de tratamiento de muestra y métodos de análisis más utilizados para la determinación del perclorato en los alimentos.

Dicha búsqueda se ha realizado siguiendo los pasos que se indican en la Figura 5, a través de diferentes bases de datos de contenido científico, como son Web of Science (WOS), Scopus, PubMed o Science Direct, de las que se han seleccionado una serie de artículos de suma importancia debido a los resultados expuestos en los mismos y las conclusiones que se pueden obtener de estos.



Figura 5. Estrategia para la búsqueda bibliográfica.

Dentro de los criterios utilizados para la selección de las referencias bibliográficas se encuentra la introducción en cada uno de los buscadores de las bases de datos, de palabras clave o frases relacionadas con el tema sobre el que se está llevando a cabo el estudio, en este caso, se han utilizado términos como, “perchlorate in vegetables”, “perchlorate analysis in vegetables”.

También es muy común el uso de operadores lógicos o booleanos, como el operador * que permite obtener las diferentes formas del término que lo contiene, o aquellos mediante los cuales, se recuperan las referencias que incluyan ambos términos (AND), cualquiera de los términos o los dos a la vez (OR), o las referencias en las que únicamente aparezca el primer término (NOT). En esta búsqueda, se han introducido operadores booleanos como “perchlorate in food*”, “perchlorate AND ion AND vegetables”, “perchlorate AND LC-MS/MS OR IC/MS-MS”. Los resultados obtenidos en las distintas búsquedas en función de las palabras clave y operadores booleanos utilizados pueden observarse en la Tabla 5.

Tabla 5. Referencias obtenidas en la búsqueda bibliográfica.

Bases de datos	Nº Referencias
Web of Science (WOS)	175
Scopus	44
PubMed	127
Science Direct	1709

La búsqueda se realizó en inglés ya que la cantidad de publicaciones en este idioma es mucho más elevada al tratarse de artículos científicos. También cabe mencionar, que en el caso de algunas bases de datos como Scopus y WOS, se han aplicado filtros de búsqueda por título, ya que sin esto, en ocasiones, el número de referencias obtenidas al introducir la sintaxis citada anteriormente era demasiado elevada y fuera de contexto. Esto último ocurre con la búsqueda en Science Direct donde la selección bibliográfica no se puede hacer de este modo, siendo por ello, mayor el número de referencias dadas con respecto al resto.

Otra de las estrategias de utilidad en la realización de esta búsqueda, una vez seleccionados algunos artículos de interés, consiste en el análisis de las citas presentes en estos artículos y referencias similares relacionadas con los mismos, de tal forma que de este modo también se pueda extraer información aún más específica.

Tras una investigación exhaustiva de las referencias bibliográficas obtenidas acerca del perclorato y los métodos utilizados para su extracción y determinación en muestras de alimentos de origen vegetal, teniendo en cuenta los criterios de búsqueda y estrategias que se han comentado, cabe destacar a modo de ejemplo representativo, en la Tabla 6, la variedad de métodos de determinación del perclorato y otros contaminantes polares utilizados hasta la actualidad, de los cuales se tratará en los apartados siguientes.

Como se puede observar en la Figura 6, la gran mayoría de las referencias, presentan su publicación a partir del año 2014, año en el cual se comenzó a legislar la presencia del perclorato como contaminante en los alimentos, y como consecuencia a restringir el uso del mismo.

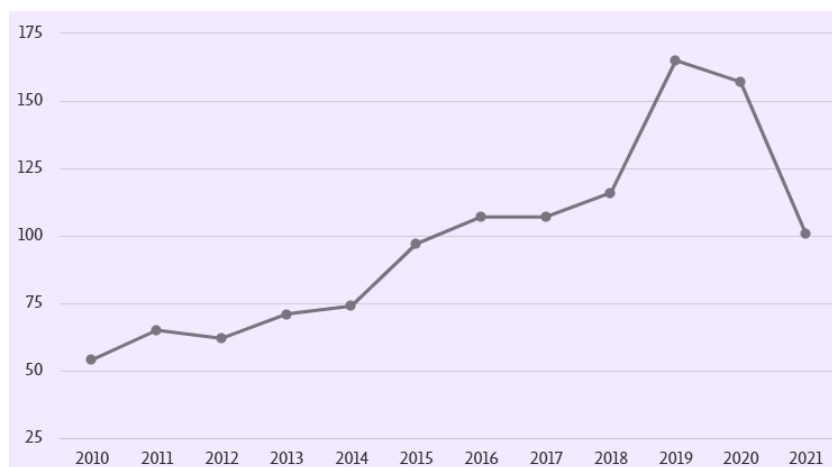


Figura 6. Referencias publicadas con la palabra clave “perchlorate in vegetables”. (Scopus).

Tabla 6. Métodos representativos de determinación del perclorato y otros contaminantes polares seleccionados tras la búsqueda bibliográfica.

Nº Analitos	Analitos	Muestra	Tratamiento	Determinación	Ref.
12	Glifosato, <i>N</i> -acetil-AMPA, ácido aminometilfosfónico (AMPA), glufosinato, ácido 3-metilfosfinopropiónico (3-MPPA), <i>N</i> -acetil glufosinato, etefón, clorato, perclorato, fosetil aluminio y ácido fosfónico	Harina de avena orgánica Uvas Alimentos para bebés (papilla cremosa)	QuPPE-PO	IC-MS/MS	(Adams, <i>et al.</i> , 2017)
4	Clorato, perclorato, etefón y ácido 2-hidroxietilfosfónico (HEPA)	Tomate, manzana, limón, sultana, aguacate y trigo	QuPPE	IC-MS/MS	(Bauer, <i>et al.</i> , 2018)
1	Perclorato	Lechuga (2 variedades: cabeza de mantequilla y cos)	SPE	IC-MS	(Calderón, <i>et al.</i> , 2014)
8	Amitrol, clormecuat, mepicuat, ciromazina, etileno tiourea (ETU), propileno tiourea (PTU), perclorato y daminozida	Zanahoria Manzana	QuEChERS	LC-MS/MS	(Chamkasem, <i>et al.</i> , 2018)
3	Clorato (ClO_3^-) Perclorato (ClO_4^-)	Mercado: hongos, puerros, pimientos, fresas, manzanas, berenjenas, peras, uvas, naranjas Plantas cultivadas: tomates cherry, maíz, melón, pimiento verde, cebolla y menta.	QuPPE	LC-MS/MS	(Constantinou, <i>et al.</i> , 2019)
2	Perclorato (ClO_4^-) Bromato (BrO_3^-)	Tomate cherry, fresa, tomate, patata, lechuga y pakchoi (col china)	QuEChERS	LC-MS/MS	(Dong, <i>et al.</i> , 2019)
1	Perclorato	Papaya, manzanas, arándanos, tomates, uvas, melocotón, limón, clementina, pera, piña, melón, plátano, pomelo, naranjas, guisantes, cebolla, kiwi, ciruela, mango, moras,	LLE: HNO_3	IC-MS/MS	(El Aribi, <i>et al.</i> , 2006)

		espárragos, setas, lichi, granada, jengibre y lechuga			
14	Pesticidas altamente polares y sus metabolitos	Uva, naranja, lechuga, avena y semillas de soja.	QuEChERS	LC-MS/MS	(Herrera, <i>et al.</i> , 2019)
1	Perclorato	Lechuga y melón	LLE: HNO ₃	IC-MS/MS	(Krynitsky, <i>et al.</i> , 2004)
1	Perclorato	Patata, lechuga, tomate y pimiento verde	SPE	IC-MS/MS	(Leoterio, <i>et al.</i> , 2017)
6	Perclorato, ácido acético, metanol, ácido fórmico, acetonitrilo, acetato de amonio.	Té (negro, verde y blanco)	SPE	LC-MS/MS	(Liu, <i>et al.</i> , 2019)
9	Clorato, etefón, fosetil aluminio, glufosinato, glifosato, N-acetil AMPA, N-acetil glifosato, perclorato y ácido fosfónico	Melón (clorato y perclorato) Piña y guisantes (clorato, perclorato y etefón) Pimienta (todos)	QuPPE-PO	IC-MS/MS	(Melton, <i>et al.</i> , 2019)
6	Glifosato AMPA Ácido fosfónico Fosetil-Al Clorato Perclorato	Sopas de verduras congeladas, verduras de hoja congeladas, legumbres congeladas, otras verduras congeladas, zumos de frutas, zumos de frutas exóticas, verduras extraídas, zumos de naranja, verduras enlatadas, purés de frutas y verduras para alimentos infantiles.	QuPPE	LC-MS/MS	(Savini, <i>et al.</i> , 2019)
1	Perclorato	Lechuga y espinacas	SPE	IC-MS	(Seyfferth, <i>et al.</i> , 2017)
1	Perclorato	Té (verde y negro)	QuEChERS	LC-MS/MS	(Wang, <i>et al.</i> , 2020)

5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL PERCLORATO Y OTROS CONTAMINANTES POLARES

Como se observa en la Tabla 6, el método más utilizado para la determinación en alimentos de contaminantes polares como el perclorato, es la cromatografía acoplada a espectrometría de masas en tándem, siendo concretamente, la cromatografía líquida e iónica las más destacadas en este tipo de análisis. La combinación de estas con la espectrometría de masas, permite que los analitos de interés puedan ser detectados en muestras altamente complejas, tanto por sus propiedades fisicoquímicas (LC, IC) como por su relación masa/carga (m/z).

5.1. Tratamiento de muestras

En los alimentos, de forma general, el analito objeto de estudio (perclorato) se encuentra presente a niveles muy bajos o trazas en relación al resto de componentes de la matriz, por lo que el primer paso para la determinación de estos compuestos, como se observa en la Figura 7, es la preparación de la muestra. En esta fase previa, se han de concentrar los analitos de interés con el fin de lograr la mayor selectividad y sensibilidad a la hora del análisis.

Como se puede ver en la tabla anterior, las técnicas más empleadas actualmente en la preparación de muestras de alimentos de origen vegetal para llevar a cabo la determinación de contaminantes polares, son el método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged & Safe*) y el método QuPPE (*Quick Polar Pesticides Method*), si bien, cabe destacar previamente, otras técnicas de extracción también de uso común en este tipo de análisis como son la extracción con disolventes (LLE, por sus siglas en inglés) y la extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés).



Figura 7. Etapas implicadas en la determinación de contaminantes en alimentos.

- **Extracción líquido-líquido (LLE)**

Es uno de los métodos más establecidos para este tipo de extracciones. Esta es una técnica relativamente simple y rápida, basada en el intercambio de un analito entre dos disolventes inmiscibles entre sí, donde el analito objetivo pasa de su disolvente de origen a un disolvente "compatible con su polaridad" en el que es más soluble.

El procedimiento de separación se suele llevar a cabo dentro de un recipiente sellado en el que la muestra previamente triturada se mezcla y homogeniza (generalmente mediante un proceso de centrifugación) con el disolvente y cierta cantidad de agua desionizada. Se utilizan diferentes disolventes de extracción para el LLE como hexano, acetonitrilo y acetato de etilo, que es uno de los disolventes de polaridad media más utilizados para la extracción de pesticidas de los alimentos. A continuación, por decantación y filtración, se retira la capa de disolvente objetivo (que contiene el analito), y se repite la extracción del líquido de muestra para aumentar la recuperación del analito. Durante la eliminación de la capa de disolvente objetivo, se debe tener especial cuidado ya que éste puede contaminarse con el líquido de muestra. Finalmente, se extraen los analitos objeto de estudio presentes en el disolvente objetivo.

Algunos estudios coinciden en el uso de ácido nítrico (HNO_3) como disolvente para la determinación de perclorato en alimentos como la lechuga y el melón, con el fin de evitar la ionización de otros coextractivos ionizables que pueden interferir con la medición de conductividad del perclorato (Krynitsky, *et al.*, 2004). Otros autores, sin embargo, proponen la utilización de este método de una forma más simplificada, únicamente mediante la adición de agua ultrapura, de manera que se requiera un menor tiempo y un coste menos elevado (El Aribi, *et al.*, 2006; Sungur, *et al.*, 2011).

A pesar de que este es uno de los métodos más ampliamente utilizados y bien establecidos para la extracción de contaminantes, debido a su fiabilidad, adaptabilidad y compatibilidad con la mayoría de instrumentación, también presenta ciertos inconvenientes como: consumo de grandes volúmenes de disolventes tóxicos, necesidad de tiempos de extracción prolongados, difícil automatización y reducción de su eficacia en el caso de compuestos polares. Además, el método LLE tampoco es específico, por lo que en ocasiones, este hecho provoca la extracción de gran parte de las moléculas de la matriz, provocando interferencias durante el posterior análisis (Narendran, *et al.*, 2020).

- **Extracción en fase sólida (SPE)**

Esta técnica de preparación, se caracteriza por su capacidad para procesar grandes cantidades de muestras con altas tasas de recuperación. En esta, se utiliza un sorbente como fase estacionaria sólida (normalmente contenido en un cartucho) para limpiar y/o concentrar los componentes de la muestra antes del análisis. Los sorbentes son típicamente soportes de sílice modificados en la superficie que proporcionan gran selectividad para retener estratégicamente el analito objetivo o las interferencias presentes en la muestra. La extracción SPE también se utiliza para el análisis de trazas, generalmente para aislar y concentrar selectivamente un analito diana conocido dentro de la muestra.

Para llevar a cabo este procedimiento, la muestra previamente pesada, es triturada y licuada con agua para su homogenización. Posteriormente, la suspensión obtenida se transfiere a tubos de centrifuga, se agita y se procede a su centrifugación. Una vez finalizada la centrifugación, se recoge el sobrenadante mediante filtración y el sólido sobrante se elimina. A continuación, una alícuota de cada muestra se pasa a través del cartucho SPE, previamente acondicionado con metanol y agua. El analito queda retenido en el cartucho y se eluye del mismo con un disolvente adecuado para su posterior análisis cromatográfico. Debido al tiempo que requiere cada una de estas etapas, la duración total de la fase de extracción y preparación de la muestra podría llegar hasta las 6 horas, dependiendo del procedimiento utilizado. (Calderón, *et al.*, 2014; Leoterio, *et al.*, 2017; Seyfferth, *et al.*, 2006).

Por tanto, como se observa en la Figura 8, los pasos a seguir para la retención y separación del analito objetivo del resto de componentes de la muestra mediante extracción en fase sólida, se pueden resumir en los siguientes:

- 1) Acondicionamiento: solvatación y activación del sorbente con el fin de retener los analitos de interés.
- 2) Carga de muestra y retención: aplicación de la muestra al cartucho (sorbente) donde se retienen los analitos de interés.
- 3) Lavado: eliminación de cualquier interferencia retenida en el sorbente.
- 4) Elución: extracción de los analitos de interés utilizando un volumen relativamente pequeño de disolvente adecuado.

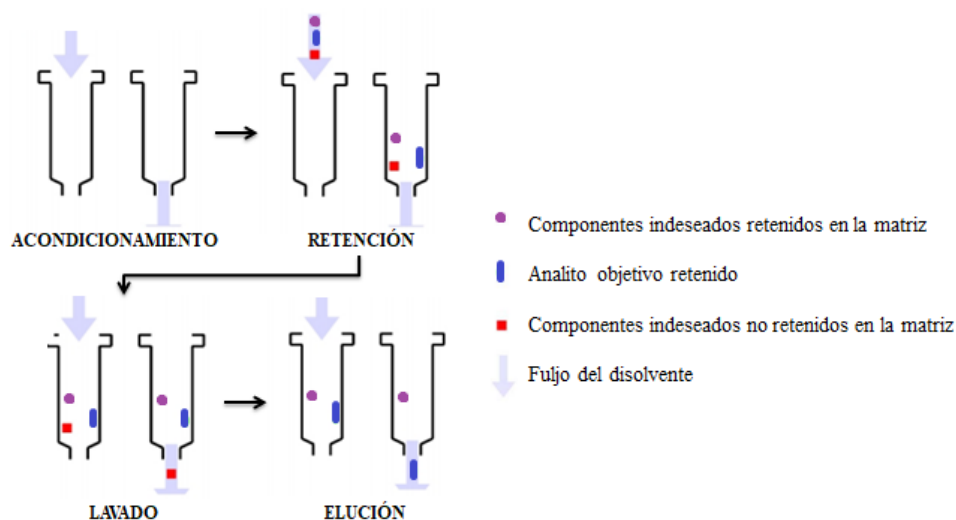


Figura 8. Representación gráfica del procedimiento de extracción SPE.

En el caso del tratamiento de muestras de alimentos de origen vegetal con extracción SPE para la determinación de contaminantes polares, productos tales como la lechuga, espinaca y demás vegetales de hoja verde son sometidos a congelación (- 22 °C) y macerados con el fin de romper las membranas y paredes de las células que constituyen la planta, consiguiéndose así la liberación del perclorato y demás contaminantes en la solución de extracción (Seyfferth, *et al.*, 2017). Esta solución es una suspensión de aproximadamente 50 ml, compuesta generalmente por cierta cantidad de muestra que puede oscilar desde 1 gramo en el caso de muestras de té (Liu, *et al.*, 2019) hasta 100 gramos cuando se trata de muestras como el tomate o la patata (Leoterio, *et al.*, 2017), agua ultrapura y agentes como el hidróxido de sodio, sulfato de sodio o el ácido acético, los cuales son utilizados para neutralizar las matrices y producir una mejor recuperación.

Los cartuchos más utilizados en la extracción SPE para el análisis y determinación de perclorato, son los cartuchos ENVI-18. Estos cartuchos ayudan a la eliminación de pigmentos y otros compuestos orgánicos presentes en el extracto de los vegetales que puedan interferir negativamente en el proceso de extracción del perclorato (Calderón, *et al.*, 2014; Leoterio, *et al.*, 2017). Otro ejemplo son los cartuchos de C₁₈, cuyo mecanismo está centrado en la retención de compuestos no polares (Liu, *et al.*, 2019; Seyfferth, *et al.*, 2006).

La extracción SPE es un método caracterizado por su sencillez, rapidez y eficiencia en el análisis, proporciona una buena separación y recuperación de matrices complejas.

Sin embargo, puede llegar a ser un proceso tedioso debido al nivel de especialización requerido para dominar su uso. Además, este método puede provocar la obstrucción de los cartuchos por la materia suspendida de las muestras y existe la posibilidad de que se dé una baja recuperación por la mala interacción de los sorbentes con los analitos (Narenderan, *et al.*, 2020).

5.1.1. Extracción QuEChERS

Uno de los mayores inconvenientes que presentan las técnicas de extracción comentadas anteriormente son los largos periodos asociados con su desarrollo. En estos últimos años, ha aumentado el uso de métodos de extracción que minimizan el tiempo de análisis, reduciendo así el número de etapas a seguir, y el volumen de disolventes utilizados.

Concretamente en 2003, Anastassiades, *et al.*, publicaron en la revista de la Asociación de Comunidades Analíticas (AOAC), un nuevo método oficial de análisis para la determinación de residuos de plaguicidas en frutas y verduras, cuyas características vienen definidas por el acrónimo con el que se identifica dicho método: “QuEChERS”, método rápido, fácil, económico, eficaz, resistente y seguro.

Como se observa en la Figura 9, este método, consiste en una extracción inicial de una sola fase de 10 g de muestra con 10 ml de acetonitrilo (ACN), seguida de una separación líquido-líquido mediante la adición de 4 g de $MgSO_4$ anhidro y 1 g de NaCl. La eliminación del agua residual y la limpieza se realizan simultáneamente a través de un procedimiento rápido llamado extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE), en el que 150 mg de $MgSO_4$ anhidro y 25 mg de sorbente de amina primaria/secundaria (PSA) se mezclan con 1 ml de extracto.

El acetonitrilo es utilizado como disolvente debido a las ventajas que este presenta sobre el resto de disolventes tales como la acetona, acetato de etilo, etc. Algunas de estas son la capacidad de dividir las fases a través del uso de sales a pesar de su miscibilidad en agua, la incompatibilidad que presenta el acetonitrilo a la hora de mezclarse con disolventes no polares como el hexano, lo cual facilita la eliminación de compuestos lipofílicos que puedan afectar durante los análisis o la posibilidad de utilizar agentes secantes (Santana, *et al.*, 2019).

Estos agentes se tratan normalmente de sales, cuya función se basa en la eliminación del exceso de agua y la mejora del proceso de extracción (Anastassiades, *et al.*, 2003). Las sales de $MgSO_4$ y $NaCl$ son utilizadas como agentes secantes en la extracción LLE ya que la adición de ambas modera la polaridad, mejorando así la recuperación de los compuestos polares como es el caso del perclorato (Santana, *et al.*, 2019).

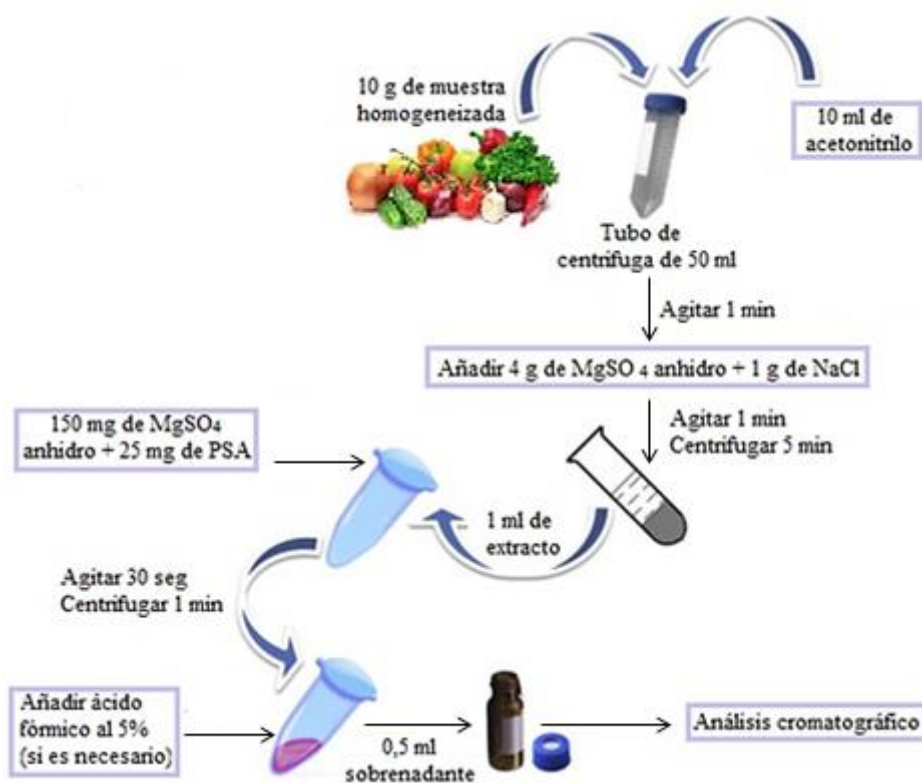


Figura 9. Esquema de aplicación del método QuEChERS.

En algunos casos, este método es utilizado para el pretratamiento de muestras, como una fase de purificación previa, con el fin de conseguir la máxima eficacia a la hora de proceder a la detección de los analitos (Santana, *et al.*, 2019). Esto hace que en ciertos estudios se realicen ciertas modificaciones con respecto al método QuEChERS original para poder detectar ciertos contaminantes en alimentos.

Con respecto al análisis del perclorato, cabe destacar que las modificaciones más comunes de la técnica QuEChERS son: la adición de agua para conseguir el traspaso completo de éste a las soluciones de extracción, como en ocurre en el caso de ciertas muestras secas como el té (Wang, *et al.*, 2020); y la selección de otro tipo de disolvente o mezclas de disolventes en función de las características de la muestra, como ácido fórmico/acetonitrilo y ácido fórmico/agua en la preparación de muestras de tomate,

lechuga, fresa y patata, que ayuden a separar de manera significativa los analitos mediante cromatografía acoplada al espectrómetro de masas (Dong, *et al.*, 2019).

En la determinación de contaminantes polares, también es común, la utilización de sorbentes distintos del PSA o en combinación con este en la fase de extracción, ya que los grupos amino presentes en la amina primaria/secundaria, tienden a adsorber los compuestos negativos como el perclorato. Por ello, la extracción del perclorato puede mejorar con el uso de sorbentes como el octadecilsilano (C18) y el carbón negro grafitizado (GCB), como se observa en la Figura 10, solos o combinados entre ellos, mejorando también la sensibilidad del método y consiguiendo un mayor porcentaje de recuperación (Nerenderan, *et al.*, 2020).

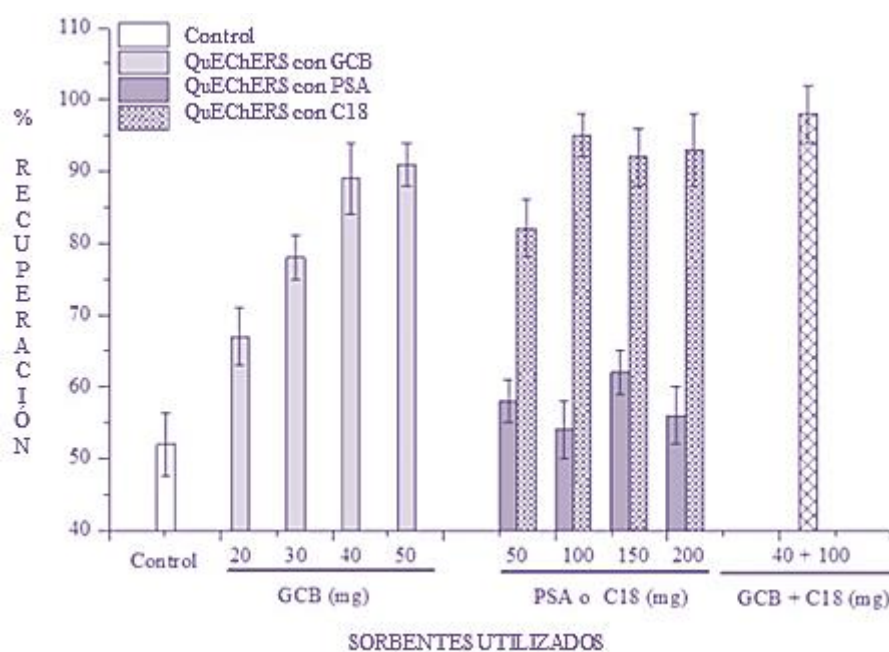


Figura 10. Recuperación de perclorato en función de los sorbentes utilizados en el método QuEChERS. (Dong, *et al.*, 2019).

El sorbente C18 retiene pigmentos, grasas y otros compuestos no polares. Por otro lado, el GCB también es utilizado para la eliminación de sustancias no polares de la matriz como pigmentos (clorofila), carotenoides y esteroides, muy presentes en frutas y verduras (Dong, *et al.*, 2019). Éste último se ha utilizado para la extracción de perclorato en muestras de té, debido a la complejidad de su composición en la que destacan principalmente pigmentos, cafeína y polifenoles, por lo que la efectividad de GCB con respecto a C18 es mayor en este tipo de matrices (Wang, *et al.*, 2020).

5.1.2. Extracción QuPPe – PO

El método para la extracción rápida de pesticidas polares (QuPPe), fue publicado por primera vez en 2009, por el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para plaguicidas que requieren métodos de residuo único (EURL-SRM), en la Versión 1 del protocolo titulado “*Quick Method for the LC-MS/MS Analysis of Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin involving a Common Extraction Step with Methanol*”. En dicha publicación, este método se define como “un método para el análisis de plaguicidas polares no aptos para QuEChERS en alimentos de origen vegetal como frutas (incluidas las frutas secas), verduras, cereales y productos procesados de los mismos”. Esta versión ha sido actualizada con el paso de los años, siendo en 2010 (Versión 4), cuando se introdujo las condiciones para la determinación de perclorato, y en 2011 (Versión 6), el acrónimo QuPPe.

Recientemente, en julio de 2021, ha sido publicada la Versión 12, en la que el método QuPPe queda definido como “un método para el análisis de residuos de plaguicidas muy polares, no aptos para QuEChERS, en alimentos de origen vegetal origen como frutas, verduras, cereales, legumbres secas, semillas oleaginosas y frutos secos, así como en la miel”. En dicha versión ya aparece la diferenciación “QuPPe-PO-Method” (método rápido de plaguicidas polares para la extracción y preparación de muestras de productos de origen vegetal), la cual se introdujo por primera vez en 2016, con la finalidad de distinguir dicho método del propuesto para los alimentos de origen animal (QuPPe-AO-Method).

El método QuPPe-PO, posibilita el análisis simultáneo de diferentes plaguicidas polares en una amplia gama de alimentos de origen vegetal, utilizando generalmente como disolvente metanol acidificado con ácido fórmico al 1% (Anastassiades, *et al.*, 2021). Para la aplicación de este procedimiento de extracción, las muestras son trituradas criogénicamente con el fin de evitar la degradación del analito y reducir el tamaño de las partículas presentes en su composición, lo que hace que se consiga una mayor homogeneidad y alcance de los residuos. Posteriormente, como se indica en la Figura 11, se introducen 10 gramos de muestra homogeneizada en un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 ml, y se ajusta el contenido de agua hasta un total de 10 ml en función del contenido propio de la composición del alimento.

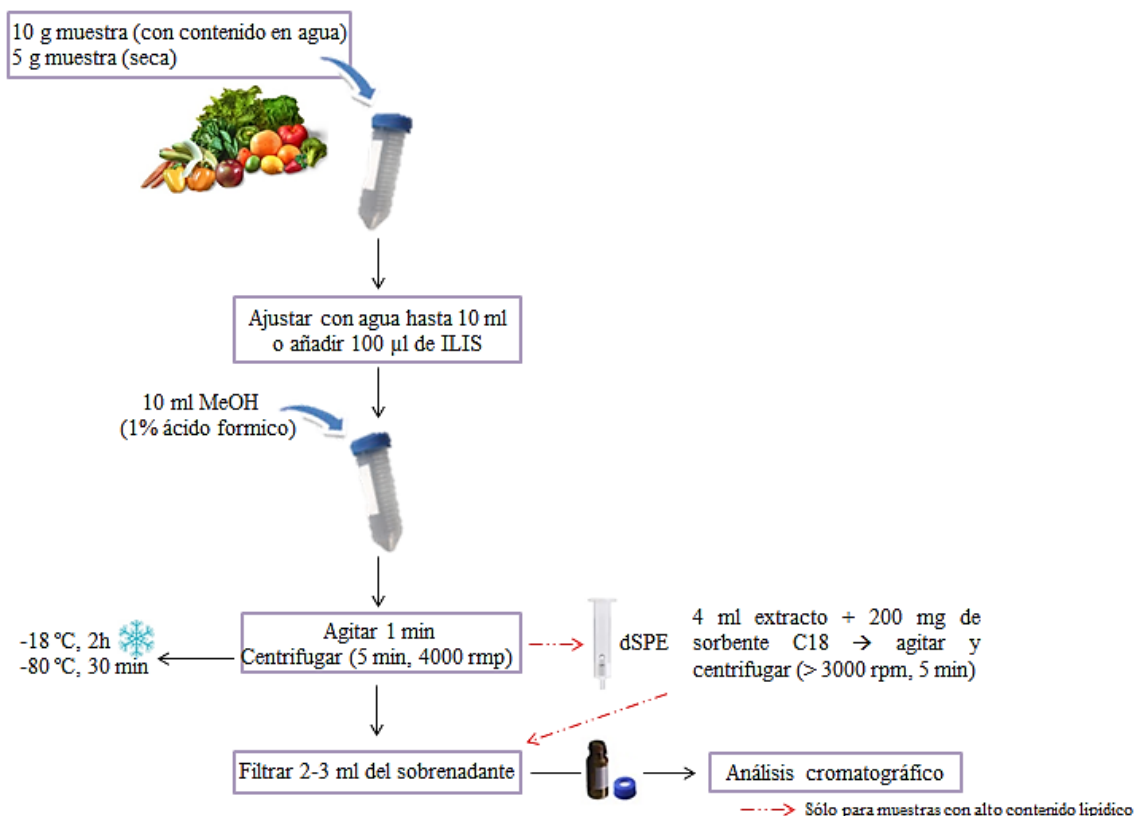


Figura 11. Esquema de aplicación del método QuPPe-PO.

Como se observa en la Tabla 7, el contenido de agua adicionada será diferente en función de la muestra con la que se esté trabajando. Para aquellas muestras cuyo contenido en agua sea del 80% al 90%, se adicionará entre 1 y 2 mililitros de agua, por el contrario en el caso de muestras secas como el té con un contenido en agua inferior al 10%, será necesario añadir para 2 gramos de muestra por cada 10 ml de agua (Anastassiades, M., *et al.*, 2019; Constantinou, *et al.*, 2019).

Tabla 7. Ajuste del contenido de agua en función del contenido propio de la muestra.

Muestra	Contenido típico de agua	Contenido de agua que adicionar
Té	-	10 ml
Uvas	8 ml	2 ml
Granada	8,5 ml	1,5 ml
Melón	9 ml	1 ml
Tomate	9,5 ml	0,5 ml

Cabe señalar, que en el caso de que se disponga de un estándar interno marcado isotópicamente (ILIS) como solución madre, no será necesario realizar el ajuste de agua, únicamente se tendrán que añadir al tubo 100 µl de este.

Tras el ajuste de agua o adición del ILIS, se añaden al tubo 10 ml de metanol (MeOH) acidificado, y se somete a un proceso de agitación durante 1 minuto y centrifugación (preferiblemente baja, -10 °C) alrededor de 4000 rpm durante 5 minutos (Savini, *et al.*, 2019). Como se puede ver en la Tabla 8, el tipo de solvente utilizado para llevar a cabo la extracción QuPPE-PO puede variar en función del compuesto polar a determinar, no obstante, en este caso, para la extracción de perclorato en alimentos, se usa metanol como el propio método indica.

Tabla 8. Solventes utilizados para la preparación de soluciones de trabajo y estándares internos. (EURL-SRM. 2021).

Compuesto	Solvente	(mg/ml)
Amitrol, Clorato, Clormequat, Ciromazina, Daminozida, ETU, Mepiquat, Perclorato , PTU	MeOH	1
Bromato	Agua/MeOH (50:50)	1
AMPA, Glufosinato, HEPA, N-Acetil-AMPA, N-Acetil-glufosinato	10% ACN en agua	1
Glifosato	10% ACN en agua	0,2
Etefón	10% ACN en agua + 0,1% HCl	1

En algunos casos, el extracto obtenido de la muestra se somete a congelación previa a la centrifugación y/o durante la misma, a temperaturas de -18 °C durante 2 horas o de -80 °C durante 30 min, para conseguir una reducción de la solubilidad de los interferentes de la matriz, aumentando como consecuencia, la precipitación de los mismos y facilitando la etapa de filtración (Anastassiades, M., *et al.*, 2019; Constantinou, *et al.*, 2019).

Una vez llevada la muestra a centrifugación, el sobrenadante es diluido con el objetivo de evitar al máximo la contaminación del instrumento por el resto de los compuestos extraídos presentes en la matriz. La dilución se realiza con agua ultrapura, variando la cantidad utilizada de esta en función de la matriz, por ejemplo, el extracto final obtenido de muestra de uva se diluye 10 veces, los extractos de muestra de melón, guisante y pimiento son diluidos 20 veces y los extractos de muestra de piña 30 veces. Tras la dilución del extracto, 2 ml de este es filtrado a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm de poro y sometido a detección cromatográfica. (Adams, *et al.*, 2017; Melton, *et al.*, 2019).

Es importante destacar, que en el caso de muestras con alto contenido lipídico como puede ser el aguacate, después del proceso de centrifugación y previo al paso final de filtrado del extracto, se realiza una extracción dispersiva en fase sólida (dSPE). Esta se lleva a cabo transfiriendo 4 ml del sobrenadante a un tubo de centrifuga de 10 ml con 200 mg del sorbente C18, se agita durante un minuto y se somete a centrifugación (> 3000 rpm) 5 minutos. No obstante, si previamente a la centrifugación, la muestra fue congelada, se puede prescindir de este paso intermedio (Anastassiades, M., *et al.*, 2019).

La mayor diferencia que presenta el método QuPPE-PO respecto a los demás métodos de extracción, es que éste no necesita etapa de limpieza. Además, a diferencia del método QuEChERS, se trata de un método simple y sólido, con capacidad de detectar simultáneamente más de un plaguicida polar con tan sólo una extracción. La sensibilidad, rapidez y robustez también son características que permiten que sea un método capaz de alcanzar altas tasas de recuperación, y pueda ser utilizado con distintos métodos cromatográficos, destacándose su aplicación en cromatografía líquida e iónica con el fin de separar y detectar como se verá en los puntos siguientes (Bauer, *et al.*, 2018; Gormez, *et al.*, 2021).

5.2. Cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

La combinación de la cromatografía líquida con la espectrometría de masas (LC-MS), es una técnica que permite el aislamiento de uno o varios analitos presentes en mezclas altamente complejas, a través de la diferenciación de los compuestos por sus propiedades físico-químicas, en la etapa cromatográfica. A su vez, permite la detección e identificación de los compuestos por su relación m/z , durante su detección en el espectrómetro de masas. Una vez dada la separación y detección de los iones mediante MS, para tener una mayor confianza en la identificación del compuesto se selecciona uno de ellos como precursor, se fragmenta y se mide la relación m/z de los iones fragmento formados (Sargent, *et al.*, 2013). Esto es lo que se conoce como espectrometría de masas en tándem o MS/MS, ya que a través de ésta se repite el ciclo de ruptura-detección de los fragmentos originados, obteniendo así más información y un análisis cuantitativo más selectivo y sensible (Romero, *et al.*, 2007).

Dicho esto, tal y como se aprecia en la Figura 12, los componentes que generalmente conforman un sistema de LC-MS/MS, son:

- Sistema de introducción de muestras: Cromatógrafo.
- Fuente de ionización para la vaporización/ionización de las moléculas diana.
- Analizador de masas para llevar a cabo la separación de los iones de la fase gaseosa por su relación m/z .
- Detector para la detección y medición de los iones separados anteriormente.



Figura 12. Componentes básicos de un sistema LC-MS/MS.

La cromatografía líquida es una técnica de separación que implica la inyección de un pequeño volumen de muestra líquida en una columna compuesta por partículas porosas empaquetadas (fase estacionaria), a través de las cuales, mediante la adición de un líquido que actúa como disolvente (fase móvil), pasan los componentes de la muestra, separándose entre sí en función del tiempo y de las interacciones que se produzcan como consecuencia de las propiedades físico-químicas de las moléculas presentes en la muestra y las que componen la columna. A la salida de la columna, una de las estrategias comunes para la identificación de los componentes es el análisis mediante LC-MS (Sargent, *et al.*, 2013).

Con respecto al uso de LC-MS y MS/MS, en los últimos años, se han desarrollado nuevos métodos basados en la utilización de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC) debido a sus características como la eficiencia cromatográfica y la sensibilidad a la hora de llevar a cabo el análisis de plaguicidas en frutas y verduras (Narendran, *et al.*, 2020). El fundamento de estas técnicas, únicamente se diferencia del método de cromatografía líquida convencional, en la separación de los componentes de la muestra, la cual, como se observa en la Figura 13, se lleva a cabo sometiendo la columna a alta presión proporcionada por una bomba. Dicha bomba tiene como función, forzar a un caudal específico (1-2 ml/min) el líquido de la fase móvil a través del cromatógrafo de líquidos sometido a alta presión.



Figura 13. Componentes de un sistema HPLC/UHPLC.

Como se ha comentado, ambas técnicas comparten el mismo fundamento, si bien, como se refleja en la Tabla 9, éstas son diferenciadas en función de la presión empleada y las características de la columna cromatográfica que se emplee. Cabe destacar que cuanto mayor sea la longitud de la columna (> 300 mm) y más bajo el tamaño de partículas (< 2 μm) y el diámetro de la misma, mayor es la presión que debe ejercer la bomba (> 1000 bar) (Agilent Technologies, 2016).

Tabla 9. HPLC vs UHPLC. (Agilent Technologies. 2016).

Características	HPLC	UHPLC
Presión de la bomba	400 bar	600 – 1200 bar
Tamaño del filtro	0,22 μm	0,45 μm
Tamaño de partículas de la columna	3 – 5 μm	< 3 μm
Longitud de la columna	50 – 300 mm	30 – 150 mm
Diámetro interno de la columna	3 – 4,6 mm	2,1 – 4,6 mm

El tipo de cromatografía empleada para la detección de perclorato y contaminantes polares es la conocida como cromatografía de fase reversa o invertida, en la cual la fase estacionaria es no polar y la fase móvil polar. El octadecilo (C18) es la fase estacionaria más utilizada para este tipo de análisis, aunque también son utilizadas como fases estacionarias en columnas de fase reversa el ácido perfluorooctánico (C8) y el dodecano (C12) (Narendran, *et al.*, 2020). Como se observa en la Tabla 10, estos pesticidas polares también se han analizado utilizando columnas de cromatografía líquida de interacción hidrófila (HILIC) y carbono grafitizado (Hypercarb), sin embargo, este tipo de columnas presentan mayores inconvenientes con respecto a las anteriores, como la necesidad de reacondicionamiento frecuente durante el análisis, lo cual requiere mucho tiempo e incrementa el coste del análisis (Herrera, *et al.*, 2019).

Las fases móviles más comunes utilizadas en el análisis de percloratos son el acetonitrilo, el metanol, y en ocasiones, mezclas de dichos disolventes con agua en

modo gradiente (el solvente de la fase móvil incrementa con el tiempo). También se emplean en la fase móvil compuestos como el ácido fórmico, formiato de amonio, ácido acético y acetato de amonio entre otros (Narendran, et al., 2020), con el fin acidificar y ajustar el pH de ésta, favoreciendo la separación cromatográfica, al mejorar la retención del perclorato y la separación de las impurezas (Liu, et al., 2019).

Tabla 10. Resumen de columnas y solventes empleados en cromatografía líquida en fase reversa.

Muestra	Fase reversa	Fase móvil	Ref
Diferentes tipos de frutas y vegetales	Columna HyperCarb (GCB) (100 x 2,1 mm, 3 µm)	A: 95% agua + 5% MeOH + Ácido acético al 1% B: MeOH + Ácido acético al 1%	(Constantinou, et al., 2019)
Zanahorias y manzanas	Columna de C18 (100 x 3 mm, 3 µm)	A: Agua/ACN (3:7) + formiato de amonio (50 Mm) B: Agua/ACN (1:9) + formiato de amonio (5 mM)	(Chamkasem, 2018)
Tomate	Columna HyperCarb (GCB) (100 x 2,1 mm, 5 µm)	A: Ácido acético al 1% en agua + MeOH B: Ácido acético al 1% en agua	(Dannehl, et al., 2015)
Tomate, lechuga, fresa, patata, y col	Columna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	A: Agua/ACN + Acetato de amonio (10 mmol/L) B: ACN	(Dong, et al., 2019)
Granada	Columna HyperCarb (GCB) (100 x 2,1 mm, 5 µm)	A: Agua/MeOH/Ácido acético (94:5:1) B: MeOH/Ácido acético (99:1)	(Gormez, et al., 2021)
Diferentes cultivos de origen vegetal	Columna HyperCarb (GCB) (100 x 2,1 mm, 5 µm)	A: Ácido acético al 1% en agua + MeOH (5%) B: Ácido acético al 1% + MeOH	(Herpple, et al., 2013)
Uva, naranja y lechuga	Columna HILIC (150 x 2,1 mm x 5 µm)	A: Agua/Ácido fórmico al 1% B: ACN	(Herrera, et al., 2019)
Vegetales de hoja, fruta y otros vegetales	Columna HyperCarb (GCB) (100 x 3 mm, 5 µm)	A (95%): ácido fórmico al 4% + MeOH B (5%): ácido fórmico al 4% + agua	(Savini, et al., 2019)
Té (verde, negro y blanco)	Columna HILIC (100 x 2,1 mm, 5 µm)	A (20%): Ácido fórmico al 0,1% + MeOH B: Acetato de amonio (10 mM) + Agua	(Liu, et al., 2019)
Té (verde y negro)	Columna HILIC (100 x 2,1 mm, 3,5 µm)	A: ACN + Agua/Ácido fórmico al 1% B: Formiato de amonio (20 mmol L ⁻¹)	(Wang, et al., 2020)

Ya que el perclorato se identifica como un anión, éste se detecta en modo negativo cuando se utiliza el espectrómetro de masas (MS). Por tanto, como se indica en el ejemplo de la Tabla 11, los parámetros de funcionamiento de MS deberán ser optimizados en el modo de ionización negativa (Liu, *et al.*, 2019).

Para muestras de alimentos, el volumen de inyección suele ser de 3 µl, aunque también podría inyectarse un volumen más alto, de hasta 5 µl. No obstante, deben evitarse volúmenes de inyección muy elevados de extracto de alimentos, con el fin de minimizar la contaminación de la fuente de ionización y proteger la columna y el espectrómetro de masas. La fuente de ionización más comúnmente utilizada en la detección de MS, es la ionización por electropulverización (ESI), ya que ésta tiene la capacidad de ionizar analitos polares (Constantinou, *et al.*, 2019; Narendran, *et al.*, 2020).

Tabla 11. Condiciones propuestas para el análisis de perclorato mediante LC-MS/MS. (EURL-SRM. 2021).

Parámetros del instrumento	Condiciones		
Modo de ionización	ESI neg		
Columna/Temperatura	Hypercarb, 100 x 2.1 mm, 5 µm; 40°C		
Prefiltro (opcional)	2 µm		
Precolumna	Hypercarb Guard 10 x 2,1 mm, 5 µm		
Eluente A	Ácido acético en agua al 1% + 5% metanol		
Eluente B	Ácido acético en metanol al 1%		
Gradiente	% A	Flujo (ml/min)	Tiempo (min)
	100	0,4	0
	70	0,4	10
	100	0,4	10,1
	100	0,4	15
Volumen de inyección	5 µl		
Dilución	1:5 metanol + ácido fórmico al 1% (1 µL extracto de muestra + 4 µL metanol + 1% ácido fórmico)		
Transiciones de masas adquiridas (m/z)	Perclorato: 99/83, 101/85 Perclorato- ¹⁸ O ₄ (ILIS): 107/89, 109/91		

La detección mediante espectrometría de masas es utilizada para añadir información estructural a partir de las masas moleculares y los patrones de fragmentación mediante MS/MS a la dimensión cromatográfica. Los espectrómetros de masas de tipo triple cuadrupolo (QqQ) configurados en modo de Monitoreo de Reacciones Múltiples (MRM) son los más utilizados para el análisis de muestras de alimentos de origen vegetal (Gormez, *et al.*, 2021; Herpple, *et al.*, 2013; Liu, *et al.*, 2019; Wang, *et al.*, 2020).

Un cuadrupolo es un analizador compuesto por cuatro barras metálicas alargadas, dispuestas paralelamente y conectadas entre sí, a las que se le aplica una combinación de voltajes (directa y radiofrecuencia). El campo formado permite separar los iones que presenten una trayectoria recta (iones resonantes) de aquellos cuya frecuencia no coincida con la del cuadrupolo (iones no resonantes), de esta forma, los iones son separados en función de su m/z y detectados al salir del analizador (Romero, *et al.*, 2007; Stashenko, *et al.*, 2010).

El MRM se utiliza con el fin de reducir las interferencias de la matriz, mediante la separación de los analitos en función de su relación m/z , logrando así un límite de detección más bajo y una mejor cuantificación (Narendran, *et al.*, 2020). Esto hace que constantemente se esté monitorizando un cierto número de m/z seleccionadas para cada analito, siendo recomendadas en el caso de la detección de iones de perclorato (ClO_4^-) las que se indican en la Tabla 11, mejorando de este modo la selectividad y sensibilidad (Constantinou, *et al.*, 2019; Sargent, 2013).

Como se observa en la Figura 13, el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, se compone como su propio nombre indica, de tres cuadrupolos consecutivos, de los cuales, el primero y el tercero son analizadores de masas (MS1 y MS2), mientras que el segundo cuadrupolo se trata de una celda de colisión (Sargent, 2013). En MS1 se produce la distinción entre los iones pertenecientes al analito y los interferentes de la matriz, posteriormente, los iones seleccionados en M1 son activados y fragmentados en la celda de colisión mediante un proceso denominado CID (Collision Induced Dissociation), en la cual se llevará a cabo la MS/MS. Finalmente, en MS2 se registrarán las señales procedentes del fragmento o los fragmentos de iones filtrados y fragmentados anteriormente. Estas señales se amplifican y digitalizan en el detector, dando como resultado un espectro de masas (Stashenko, *et al.*, 2010).

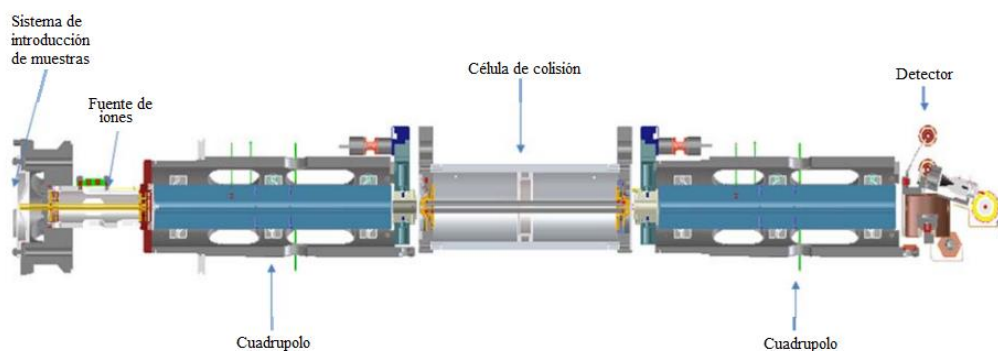


Figura 13. Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. (Sargent, 2013).

La selectividad dada por la combinación de ambas técnicas hace que LC-MS sea una herramienta analítica altamente eficaz, ya que el espectrómetro de masas no sólo actúa como detector para la cromatografía, sino que también, como se observa en la Figura 14, permite la identificación de las especies presentes en la muestra y asociadas con cada uno de los picos cromatográficos (Sargent, *et al.*, 2013).

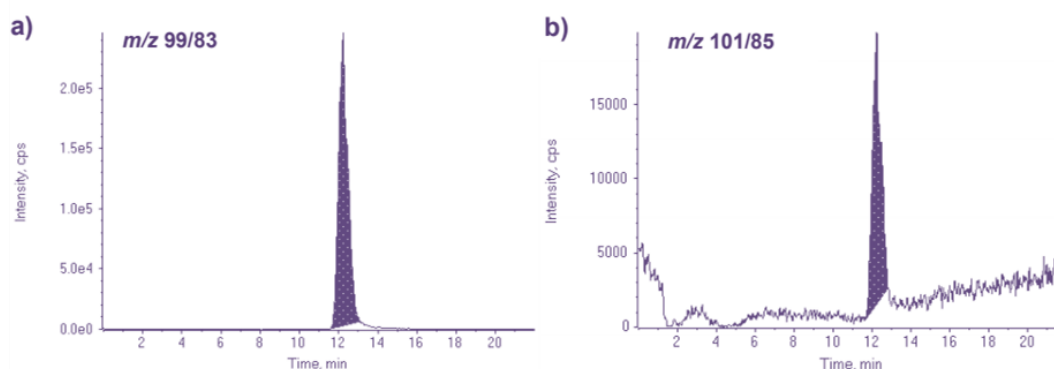


Figura 14. Cromatograma de perclorato obtenido con LC-MS/MS de una muestra de manzana. (Herpple, *et al.*, 2013).

Tal y como se indica en la Tabla 12, la utilización de LC-MS/MS como método para la determinación de contaminantes polares en alimentos, presenta ciertas limitaciones, pudiendo ser algunas de ellas eliminadas o reducidas, como es el caso de los efectos de la matriz, los cuales, generalmente pueden reducirse con la dilución de la muestra y la adición de estándares internos (Chamkasem, 2018). Estas interferencias también podrán ser mitigadas durante la etapa cromatográfica, separando de forma física el analito y la interferencia, siendo estos eluidos a través de la columna en diferentes tiempos, o la fase de extracción, eliminando selectivamente la interferencia en la etapa de preparación de muestra (Sargent, 2013), teniendo en cuenta esto, se puede decir que el número de ventajas de este método es mayor frente al de desventajas.

Tabla 12. Ventajas y desventajas de la LC/MS-MS. (Sargent, 2013).

VENTAJAS	
Selectividad	Análisis de mezclas complejas, aislamiento y medición correcta de uno o varios analitos, separación por masa (posibilidad de uso de patrones internos marcados isotópicamente).
Rapidez	Tiempos de análisis de la LC rápidos (no se tienen que separar todos los componentes de la muestra), preparación de muestras reducida, alto rendimiento.
Sensibilidad	Buena selectividad, reducción del ruido, nivel de detección muy bajo.
DESVENTAJAS	
Altos costes	Espectrómetros de masas costosos. Requieren de un servicio regular.
Complejo	Difícil optimización, mecanismo de ionización complicado, los analistas han de recibir formación específica.
Rango de respuesta limitado	Puede tener un rango donde la respuesta es lineal con respecto a la concentración.
Efectos en la matriz	Mecanismo de ionización alterado por otros componentes de la muestra que pueden ser eluidos con el analito de interés.

5.3. Cromatografía iónica combinada con espectrometría de masas en tándem (IC-MS/MS).

La cromatografía iónica también ha sido reconocida como una herramienta de eficacia para la determinación de perclorato y otros contaminantes en alimentos (Anastassiades, *et al.*, 2021). Al igual que la cromatografía líquida, esta técnica, consta de una fase móvil y una fase estacionaria. En la mayoría de los casos la fase móvil se compone de agua, mientras que la fase estacionaria, está formada por intercambiadores de iones poliméricos (Rajski, *et al.*, 2018).

Dicho método de determinación, al igual que se ha descrito en el apartado anterior, se lleva a cabo, principalmente, acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, siendo los principales componentes que conforman un sistema de IC-MS/MS los siguientes:

- Sistema de bombeo
- Generador de eluyente

- Columna de trampa de regeneración continua (CR-TC)
- Automuestreador
- Columna de separación cromatográfica de intercambio aniónico
- Supresor de eluyente (regenerado electrolíticamente)
- Detector de conductividad
- Modificador de disolvente orgánico
- Fuente de ionización (ESI)
- Espectrómetro de masas
- Procesador de datos

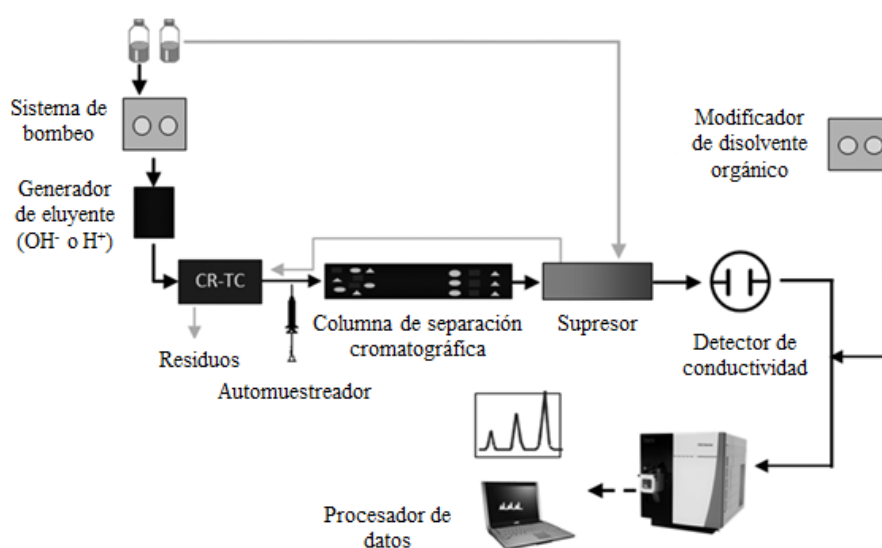


Figura 15. Componentes de un sistema IC-MS/MS. (Adams, *et al.*, 2017; Melton, *et al.*, 2019).

En general, en la cromatografía iónica, se utiliza una columna que contiene una resina de intercambio iónico para separar el anión. Varios estudios coinciden en la utilización de la columna AS16, ya que ésta se trata de una columna de intercambio aniónico hidrófila con gran capacidad para llevar a cabo el análisis simultáneo de grandes aniones polarizables como es el perclorato (El Aribi, *et al.*, 2006; Ellington, *et al.*, 2000; Seyfferth, *et al.*, 2006).

Los eluyentes más comúnmente utilizados en este tipo de columnas, son el hidróxido de sodio (Ellington, *et al.*, 2000; Yu, *et al.*, 2004) y el carbonato de sodio (Gu, *et al.*, 2006), sin embargo, otros estudios exponen al hidróxido de potasio (KOH) como eluyente en la fase móvil (Adams, *et al.*, 2017; El Aribi, *et al.*, 2006; Melton, *et al.*, 2019). El KOH no es compatible con el espectrómetro de masas, por lo que el

cromatógrafo no se puede conectar directamente al MS, ya que su composición abundan sales no volátiles que al ser compatibles con el acero inoxidable que compone dicho equipo, pueden precipitar en la fuente de ionización e influir negativamente en la sensibilidad del espectrómetro (Mathew, *et al.*, 2005; Rajska, *et al.*, 2018). Es por ello, por lo que normalmente se usa un dispositivo supresor de eluyente. Este dispositivo, se trata de una columna que actúa neutralizando el eluyente y convirtiendo las sales en ácidos, mejorando la conductividad del analito, suprimiendo a su vez la conductividad del eluyente, de modo que pueden llegar a alcanzarse límites de detección de partes por billón (ppb) para aniones y cationes sin preconcentración (Ellington, *et al.*, 2000).

Tanto el eluyente como el eluyente regenerado electrolíticamente fluyen a través de la CR-TC, la cual es utilizada para desviar y desechar cualquier resto de hidróxido o residuos de la fase móvil que puedan entrar en el MS. Si se diera este caso, para recuperar el rendimiento perdido, debería de llevarse a cabo la ventilación y limpieza de las superficies del sistema de MS (Mathew, *et al.*, 2005).

La densidad de carga del perclorato es baja, siendo éste fuertemente retenido en la mayoría de las columnas, dando como resultado picos con formas poco definidas cuando es eluido de éstas. Por tanto, como se observa en la Figura 15, para evitar esta retención, y promover la elución del perclorato, se añaden a la fase móvil disolventes orgánicos o aniones de mayor hifrofobicidad que el perclorato son añadidos a la fase móvil (Gu, *et al.*, 2006).

Con respecto al uso de disolventes orgánicos, se ha comprobado que el metanol aumenta de forma significativa la contrapresión como consecuencia de su viscosidad, lo que hace que el caudal de la fase móvil pueda verse afectado. Es por ello por lo que como aparece en la Tabla 13, algunos estudios optan por el empleo de otros disolventes de menor viscosidad como el acetonitrilo (Adams, *et al.*, 2017; Bauer, *et al.*, 2018; El Aribi, *et al.*, 2006), que aseguren una adecuada contrapresión, y sirva de ayuda en la desolvatación de los iones presentes en la fase móvil, mejorando así la sensibilidad de detección (Krynitsky, *et al.*, 2004).

Tabla 13. Disolventes utilizados para la determinación mediante IC-MS/MS de perclorato en alimentos.

Muestra	Eluyente	Modificador de disolvente orgánico	Ref
Harina de avena orgánica, uvas y papilla para bebés	KOH	Acetonitrilo (0,2 ml/min)	(Adams, <i>et al.</i> , 2017)
Variedad de frutas y verduras (manzana, piña, lechuga, naranja, etc.)	KOH	Acetonitrilo/Agua 90:10 (0,3 ml/min)	(El Aribi, <i>et al.</i> , 2006)
Lechuga y tomates	NaOH	Acetonitrilo	(Ellington, <i>et al.</i> , 2000)
Lechuga y melón	Acetato de amonio	Acetonitrilo/Agua 50:50	(Krynitsky, <i>et al.</i> , 2004)
Lechuga	NaOH	Metanol al 30% (0,8 ml/min)	(Mathew, <i>et al.</i> , 2005)
Melón, guisantes y piña	KOH	Acetonitrilo	(Melton, <i>et al.</i> , 2019)
Lechuga, espinacas	NaOH	Acetonitrilo/Agua (0,6 ml/min)	(Seyfferth, <i>et al.</i> , 2006)
Tomate, zanahoria, melón, cebolla y naranja	KOH	Acetonitrilo (0,4 ml/min)	(Rajsky, <i>et al.</i> , 2018)

6. PROPUESTA DE UN MÉTODO Y JUSTIFICACIÓN

Teniendo en cuenta que este trabajo de investigación podría desarrollarse en un laboratorio, a continuación se propone, de manera resumida un ejemplo de un método para el análisis del perclorato en muestras de alimentos de origen vegetal, teniendo en cuenta los equipos presentes en los laboratorios de la Universidad de Jaén (UJA), y las técnicas de análisis de muestra y de determinación de dicho contaminante desarrolladas en los apartados anteriores. Dada la complejidad del trabajo en el laboratorio y las posibles contingencias derivadas del trabajo diario, el modelo descrito refleja de manera objetiva los pasos a seguir durante el análisis, teniendo en cuenta los medios disponibles y los métodos anteriormente citados en la bibliografía.

Para llevar a cabo este estudio, se seleccionarán diferentes muestras de lechuga, pues como se ha mencionado, el mayor contenido de perclorato, se encuentra entre otros, en los vegetales de hoja verde.

Tras consultar los recursos científicos de los que dispone el Departamento de Química Física y Analítica de la UJA, y valorar las ventajas e inconvenientes respecto al uso de las técnicas comentadas con anterioridad, el método de análisis indicado para

poner en práctica este trabajo en el laboratorio, sería la extracción QuPPE-PO (Anastassiades, *et al.*, 2021) junto con la determinación LC-MS/MS, ya que es un método validado por el EURL-SRM, con el que se asegura la obtención de resultados fiables. Los materiales necesarios para llevar a cabo este procedimiento serían los indicados en la Tabla 14.

Tabla 14. Materiales para la extracción y determinación de perclorato mediante QuPPE-PO y LC-MS/MS.

Aparatos y Equipos		Productos químicos
Equipo de procesamiento de muestras	Equipo UHPLC-MS/MS	Agua desionizada
Tubo de polipropileno (50 ml)	Jeringa	Agua ultrapura
Pipetas automáticas	Filtro de jeringa (0,2 µm de poro)	MeOH
Agitador mecánico	Vial automuestreador de plástico	Ácido acético
Centrífuga	Columna GCB	Ácido fórmico

Tal y como se observa en el esquema de la Figura 16, para el procesamiento y homogeneización de la muestra se utilizaría agua ultrapura, con el fin ajustar el contenido de ésta hasta 10 ml. Según la Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA), el contenido de agua de la lechuga es de 95,2 g/100 g de porción comestible. Teniendo en cuenta que para cada extracción se necesitan 10 g de muestra, el contenido de agua presente en este caso sería de 9,52, por lo que deberían de adicionarse 0,5 ml de agua.

Una vez homogeneizada la muestra, se adicionarán 10 ml de metanol acidificado con ácido fórmico, el cual se prepararía añadiendo 10 ml de ácido fórmico en un matraz aforado de 1000 ml, enrasando hasta el aforo con metanol. Tanto la homogeneización previa como el proceso de centrifugación tras el ajuste con agua y la adición del MeOH acidificado, se intentará llevar a cabo bajo condiciones de congelación con el fin de provocar una mayor precipitación de los componentes de la matriz, y facilitar el resto de las etapas del proceso.

Para finalizar el proceso de extracción de muestra, se filtrará una alícuota (2-3 ml) del sobrenadante obtenido a través de una jeringa con un filtro de 0,2 µm en un vial automuestreador, a ser posible de plástico, ya que en ocasiones algunos componentes tienden a interactuar con el cristal (Anastassiades, *et al.*, 2021).

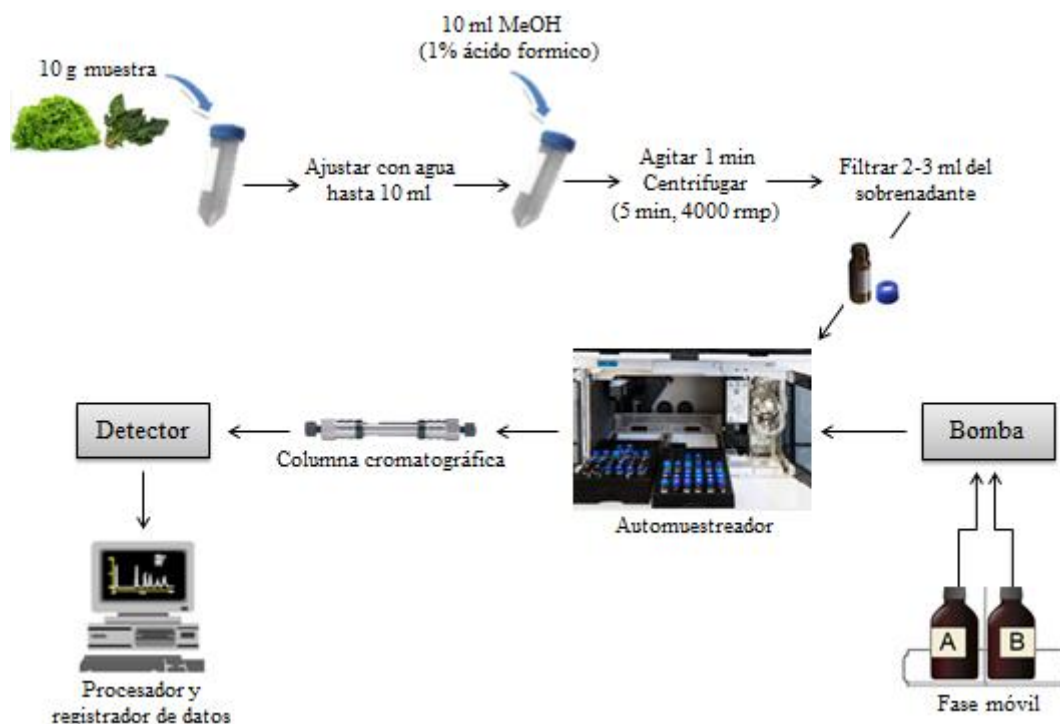


Figura 16. Esquema determinación de perclorato QuPPE-PO/UHPLC-MS/MS.

Como se aprecia en la Figura 17, el equipo que se utilizaría para la determinación y cuantificación del perclorato presente en el extracto de muestra obtenido, sería un cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución acoplado a un espectrómetro de masas de tipo triple cuadrupolo (UHPLC-MS/MS (QQQ)).

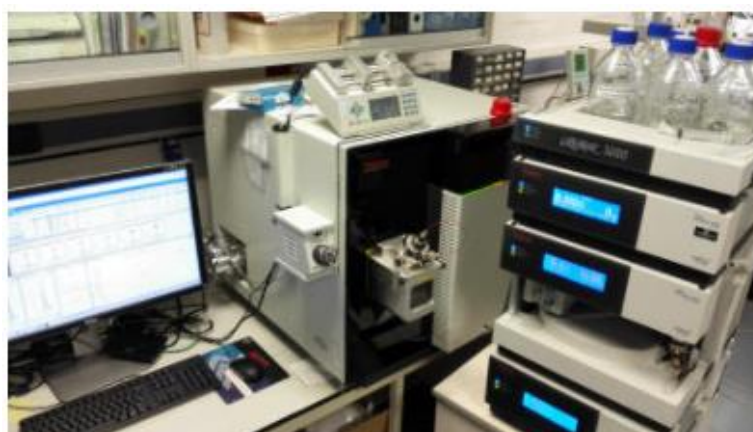


Figura 17. UHPLC-MS/MS (QQQ).

Dionex Ultimate 3000 acoplado con TSQ-Quantiva (Thermo Scientific).

Departamento de Química Física y Analítica (UJA). Grupo de Investigación FQM-323.

Siguiendo con las recomendaciones del EURL-SRM, y considerando la compatibilidad del equipo seleccionado con los instrumentos necesarios para el funcionamiento del mismo, para llevar a cabo el análisis cromatográfico, se optará por

la selección de una columna de GCB Hypercarb de 100 mm de largo y 2.1 mm de diámetro, pero con un tamaño de partícula de 2 µm ya que se trata de UHPLC.

La fase móvil utilizada para llevar a cabo la cromatografía estaría compuesta de ácido acético al 1% en agua + MeOH al 5% (A), y ácido acético al 1% en MeOH (B), con un flujo de 0,3 ml/min, y un volumen de inyección de 3 µl.

Como se ha indicado en puntos anteriores, a la hora de llevar a cabo estos procedimientos en el laboratorio pueden presentarse ciertas limitaciones, por lo que a continuación, en la Tabla 15 se proponen una serie de actuaciones con el fin de mejorar y evitar la aparición de problemas durante la aplicación del método propuesto.

Tabla 15. Recomendaciones para reducir la aparición de inconvenientes durante el desarrollo del método.

Medida	Procedimiento	Finalidad
Adición de un ILIS (Perclorato- ¹⁸ O ₄)	Durante la extracción QuPPE-PO, añadir junto con los 10 ml de MeOH, 100 µl del ILIS	Corregir los efectos de recuperación y de la matriz
Acondicionamiento de la columna previo al análisis	Preparación de un blanco de la muestra	Mejorar el comportamiento cromatográfico y evitar la aparición de interferencias
Utilización de alta T ^a en la columna cromatográfica	Ajustar el compartimento de la columna a una T ^a en torno a unos 40 °C	Disminuir la viscosidad del solvente y la contrapresión ejercida por otras partículas

7. CONCLUSIONES

Tras la revisión bibliográfica llevada a cabo en este Trabajo de Fin de Máster basada en la determinación de perclorato en alimentos de origen vegetal, se han obtenido las siguientes conclusiones:

- Numerosas publicaciones coinciden en que la mayor fuente de contaminación por perclorato se encuentra en alimentos de origen vegetal debido al contacto de estos con agua contaminada.
- Existe una estrecha relación entre la eficiencia de la captación de yodo en el cuerpo humano y el consumo de alimentos con alto contenido en perclorato, siendo los grupos más vulnerables los fetos y lactantes.

- Se necesitan sistemas de monitorización del anión perclorato, dada su gran incidencia como contaminante en alimentos de consumo común como la patata o la lechuga.
- El método QuPPE-PO es considerado como el método por excelencia para la extracción de perclorato en muestras de alimentos de origen vegetal. Este método a diferencia de otros, permite la extracción eficaz de contaminantes de gran polaridad.
- La mayoría de los estudios científicos evaluados en este trabajo proponen técnicas híbridas de cromatografía y espectrometría de masas tándem como los métodos más efectivos para la determinación y cuantificación de perclorato y de otros contaminantes polares en alimentos.
- Gran parte de la bibliografía revisada apuesta por métodos de detección basados en los sistemas HPLC o UHPLC combinados con MS/MS (QqQ). Estas metodologías permiten una alta sensibilidad y selectividad, además de análisis rápidos de perclorato.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, S. (2016). *The role of ion chromatography in food safety Laboratories*. Disponible en web: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/AR-IC-MS-Food-Safety-Labs-LCGC-0716-EN.pdf>
- Adams, S., Guest, J., Dickinson, M., Fussell, R.J., Beck, J., Schoutsen, F. (2017). *Development and validation of ion chromatography-tandem mass spectrometry-based method for the multiresidue determination of polar ionic pesticides in food*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 65, 7294-7304.
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). (2020a). *Perclorato*. Disponible en web: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/ampliacion/perclorato.htm

- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). (2020b). *Residuos de productos fitosanitarios*. Disponible en web: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/detalle/residuos_productos_fitosanitarios.htm
- Agilent Technologies. (2016). *The LC handbook: Guide to LC Columns and Method Development*. Disponible en web: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/LC-Handbook-Complete-2.pdf>
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Štajnbaher, D., Schenck, FJ. (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 (2), 412-431.
- Anastassiades, M., Wachtler, A.K., Kolberg, D.I., Eichhorn, E., Marks, H., Benkenstein, A., Zechmann, S., Mack, D., Wildgrube, C., Barth, A., Sigalov, I., Görlich, S., Dörk, D., Cerchia, G. (2021). *EURL-SRM. Quick Method for the Analysis of Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC or IC-MS/MS Measurement. I. Food of Plant Origin (QuPPE-PO-Method)*.
- Bauer, A., Luetjohann, J., Rohn, S., Kuballa, J., Jantzen, E. (2018). *Ion chromatography tandem mass spectrometry (IC-MS/MS) multimethod for the determination of highly polar pesticides in plant-derived commodities*. *Food Control*, 86, 71-76.
- Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA). Disponible en web: <https://www.bedca.net/>
- Calderón, R., Godoy, F., Escudey, M. Palma, P. (2017). *A review of perchlorate (ClO_4^-) occurrence in fruits and vegetables*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189, 82.

- Calderón, R., Palma, P., Parker, D., Escudey, M. (2014). *Capture and accumulation of perchlorate in lettuce. Effect of genotype, temperature, perchlorate concentration, and competition with anions. Chemosphere, 111, 195-200.*
- Chamkasem, N. (2018). *Rapid determination of polar pesticides and plant growth regulators in fruits and vegetables by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 53, 622-631.*
- Constantinou, P., Louca-Christodoulou, D., Agapiou, A. (2019). *LC-ESI-MS/MS determination of oxyhalides (chlorate, perchlorate and bromate) in food and water samples, and chlorate on household water treatment devices along with perchlorate in plants. Chemosphere, 235, 757-766.*
- Dannehl, D., Schuch, I., Gao, Y., Cordiner, S., Schmidt, U. (2016). *Effects of hypochlorite as a disinfectant for hydroponic systems on accumulations of chlorate and phytochemical compounds in tomatoes. European Food Research and Technology, 242, 345-353.*
- Dong, H., Xiao, K., Xian, Y., Wu, Y., Zhu, L. (2019). *A novel approach for simultaneous analysis of perchlorate (ClO_4^-) and bromate (BrO_3^-) in fruits and vegetables using modified QuEChERS combined with ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Chemistry, 270, 196-203.*
- El Aribi, H., Le Blanc, Y.J.C., Antonsen, S., Sakuma, T. (2006). *Analysis of perchlorate in foods and beverages by ion chromatography coupled with tandem mass spectrometry (IC-ESI-MS/MS). Analytica Chimica Acta, 256, 39-47.*
- Ellington, J.J., Evans, J.J. (2000). *Determination of perchlorate at parts-per-billion levels in plants by ion chromatography. Journal of Chromatography A, 898, 193-199.*
- European Food Safety Authority (EFSA). (2014). *Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of perchlorate in food, in particular fruits and vegetables. EFSA Journal, 12 (10), 3869.*

- European Food Safety Authority (EFSA). (2017). *Scientific Opinion on the dietary exposure assessment to perchlorate in the European population*. *EFSA Journal*, 15 (10), 5043.
- EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides (EURL-SRM). Disponible en web: <https://www.eurl-pesticides.eu>.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT). (2021). Pesticides Use. Disponible en web: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>
- Food Safety - European Commission. (2021). Perchlorate. Disponible en web: https://ec.europa.eu/food/safety/chemical_safety/contaminants/catalogue/perchlorate_en
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria (Elika). (2021). *Percloratos*. Disponible en web: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/percloratos/#exposicion>
- Gormez, E., Golge, O., Kabak, B. (2021). *Quantification of fosetyl-aluminium/phosphonic acid and other highly polar residues in pomegranates using Quick Polar Pesticides method involving liquid chromatography-tandem mass spectrometry measurement*. *Journal of Chromatography A*, 1642.
- Gu, B., Coates, J.D. (2006). *Perchlorate. Environmental Occurrence, Interactions and Treatment*.
- Haddad, P.R., Doble, P., Macka, M. (1999). *Developments in sample preparation and separation techniques for the determination of inorganic ions by ion chromatography and capillary electrophoresis*. *Journal of Chromatography A*, 856, 154-177.
- Hepperle, J., Wolheim, A., Kolberg, D., Wildgrube, C., Kaufmann-Horlacher, I., Anastassiades, M., Scherbaum, E. (2013). *Analysis of Perchlorate in Food Samples of Plant Origin Applying the QuPPE-Method and LC-MS/MS. Aspects of food control and animal health*.

- Herrera, S., Scholte, J., Kiedrowska, B., de Kok, A. (2019). *Method validation and application of a selective multiresidue analysis of highly polar pesticides in food matrices using hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1594, 93-104.*
- Krynitsky, J.A., Niemann, R.A., Nortrup, D.A. (2004). *Determination of Perchlorate Anion in Foods by Ion Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Analytical Chemistry, 76, 5518-5522.*
- Kumarathilaka, P., Oze, C., Indraratne, S.P., Vithanage, M. (2016). *Perchlorate as an emerging contaminant in soil, water and food. Chemosphere, 150, 667-677.*
- Leoterio, D.M.S., Paim, A.P.S., Belian, M.F., Galembeck, A., Lavorante, A.F., Pinto, E., Amorim, C.G., Araújo, A.N., Montenegro, M.C.B.S.M. (2017). *Potentiometric perchlorate determination at nanomolar concentrations in vegetables. Food Chemistry, 227, 166-172.*
- Liu, Y., Sun, H., Zhou, L., Luo, F., Zhang, X., Chen, Z. (2019). *Quantitative determination and contamination pattern of perchlorate in tea by ultra performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. Food Chemistry, 274, 180-186.*
- Maffini, M.V., Trasande, L., Neltner, T.G. (2016). *Perchlorate and Diet: Human Exposures, Risks, and Mitigation Strategies. Current Environmental Health Reports, 3, 107–117.*
- Mathew, J., Gandhi, J., Hedrick, J. (2005). *Trace level perchlorate analysis by ion chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1085, 54-59.*
- Melton, L.M., Taylor, M.J., Flynn, E.E. (2019). *The utilisation of ion chromatography and tandem mass spectrometry (IC-MS/MS) for the multi-residue simultaneous determination of highly polar anionic pesticides in fruit and vegetables. Food Chemistry, 298.*

- Narenderan, S.T., Meyyanathan, S.N., Babu, B. (2020). *Review of pesticide residue analysis in fruits and vegetables. Pre-treatment, extraction and detection techniques. Food Research International, 133, 109-141.*
- Rajski, Ł., Díaz, F.J., Cutillas, V., Fernández-Alba, A. (2018). *Coupling Ion Chromatography to Q-Orbitrap for the Fast and Robust Analysis of Anionic Pesticides in Fruits and Vegetables. Journal of AOAC International, 101 (2), 352-359.*
- Recomendación (UE) 2015/682 DE LA COMISIÓN de 29 de abril de 2015 relativa al seguimiento de la presencia de perclorato en los alimentos.
- REGLAMENTO (UE) 2020/685 DE LA COMISIÓN de 20 de mayo de 2020 que modifica el Reglamento (CE) nº 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de perclorato en determinados alimentos.
- REGLAMENTO (UE) 2020/749 DE LA COMISIÓN de 4 de junio de 2020 que modifica el anexo III del Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de clorato en determinados productos.
- Romero, R., Fernández, J.L., Plaza, P., Garrido, A., Martínez, J.L. (2007). *Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria. Revista Española de Salud Pública, 81(5), 461-474.*
- Sánchez, C.A., Crump, K.S., Krieger, R.I., Khandaker, N.R., Gibbs, J.G. (2005). *Perchlorate and Nitrate in Leafy Vegetables of North America. Environmental Science & Technology, 39, 9391-9397.*
- Santana, A., Socas, B., Herrera, A.V., Rodríguez, M.A. (2019). *Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis. Trends in Analytical Chemistry, 116, 214-235.*

- Sargent, M. (2013). *Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements*. Disponible en web:
https://www.rsc.org/images/AMC%20LCMS%20Guide_tcm18-240030.pdf
- Savini, S., Bandini, M., Sannino, A. (2019). *An Improved, Rapid, and Sensitive Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-High-Resolution Orbitrap Mass Spectrometry Analysis for the Determination of Highly Polar Pesticides and Contaminants in Processed Fruits and Vegetables*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 2716-2722.
- Seyfferth, A.L., Parker, D.R. (2006). *Determination of Low Levels of Perchlorate in Lettuce and Spinach Using Ion Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry (IC-ESI-MS)*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2012-2017.
- Stashenko, E., René, J. (2010). *GC-MS: Más de un Analizador de Masas, ¿Para qué?* Instituto Internacional de Cromatografía. *Scientia Chromatographica*, 2 (4), 25-48.
- Steinmaus, C.M. (2016). *Perchlorate in Water Supplies: Sources, Exposures, and Health Effects*. *Current Environmental Health Reports*, 3, 136-143.
- Sungur, S., Sangün, KM. (2011). *Ion chromatographic determination of perchlorate in foods consumed in Hatay region*, *Food Chemistry*, 126, 326-331.
- Wang, C., Chen, H., Zhu, L., Lu, C. (2020). *Accurate, sensitive and rapid determination of perchlorate in tea by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry*. *Analytical Methods*, 12, 3592-3599.
- Yu, L., Cañas, J.E., Cobb, G.P., Jackson, W.A., Anderson, T.A. (2004). *Uptake of perchlorate in terrestrial plants*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58, 44-49.

9. ANEXO DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
CONTAM	Comisión Técnica de Contaminantes de la Cadena Alimentaria
CR-TC	Columna de Trampa de Regeneración Continua
dSPE	Extracción dispersiva en fase sólida
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ESI	Ionización por Electropulverización
EURL-SRM	Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para plaguicidas que requieren métodos de residuo único
GCB	Carbón Negro Grafitizado
HILIC	Cromatografía Líquida de Interacción Hidrófila
IC-MS/MS	Cromatografía Iónica combinada con espectrometría de masas en tándem
LC-MS/MS	Cromatografía Líquida combinada con espectrometría de masas en tándem
ILIS	Estándar interno marcado isotópicamente
LLE	Extracción líquido-líquido
LMR	Límite Máximo de Residuos
MRM	Monitoreo de Reacciones Múltiples
MS	Espectrómetro de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
NIS	Simportador de yoduro de sodio

PSA	Amina primaria/secundaria
QqQ	Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged & Safe
QuPpe	Quick Polar Pesticides Method
QuPpe-PO	Quick Method for the Analysis of Residues of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin
SPE	Extracción en fase sólida