



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis de residuos de pesticidas y medicamentos veterinarios en productos avícolas mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas

Alumna: Irene Caño Carrillo

Junio, 2020



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis de residuos de pesticidas y medicamentos veterinarios en productos avícolas mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas

Alumna: Irene Caño Carrillo

Jaén, Junio de 2020

Fdo. Irene Caño Carrillo

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	2
3.1.Importancia del sector avícola: huevos y carne de pollo.....	3
3.2.Seguridad alimentaria.....	5
3.3.Clasificación de contaminantes en alimentos.....	6
3.3.1. <i>Clasificación de productos veterinarios.....</i>	<i>6</i>
3.3.2. <i>Clasificación de pesticidas.....</i>	<i>8</i>
3.4.Límite máximo de residuos en pesticidas y productos veterinarios.....	9
3.4.1. <i>Límites máximos de residuos y alertas sanitarias en huevo y pollo.....</i>	<i>11</i>
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PESTICIDAS Y PRODUCTOS VETERINARIOS EN HUEVO Y CARNE DE POLLO.....	20
5.1.Tratamiento de muestra en huevo y carne de pollo.....	20
5.1.1. <i>Extracción con disolventes: Líquido-Líquido (LLE) y Sólido-Líquido (SLE).....</i>	<i>21</i>
5.1.2. <i>Extracción en Fase Sólida (SPE).....</i>	<i>24</i>
5.1.3. <i>Extracción QuEChERS.....</i>	<i>27</i>
5.2.Cromatografía de líquidos acoplada con espectrometría de masas.....	31
6. PROPUESTA DE UN MÉTODO Y JUSTIFICACIÓN.....	38
7. CONCLUSIONES.....	39
8. BIBLIOGRAFÍA.....	39

1. RESUMEN

En este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica sobre el análisis de residuos de pesticidas y productos veterinarios en huevo y carne de pollo. Para ello, la discusión se ha dividido en dos partes. Por un lado, se han evaluado los métodos de tratamiento de muestra más frecuentemente utilizados, entre los que se encuentran la extracción con disolventes, la extracción en fase sólida y el método QuEChERS. En lo referente a los métodos de detección y cuantificación analítica, se han comparado las diferentes alternativas que ofrece la cromatografía de líquidos acoplada con espectrometría de masas (LC/MS) en el análisis de contaminantes en muestras alimentarias. Esta revisión bibliográfica permitió realizar la propuesta de un método para el análisis de pesticidas y residuos veterinarios en huevo y carne de pollo basado en el uso del método QuEChERS como etapa de tratamiento de muestra, seguida del empleo cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con un analizador de tiempo de vuelo (LC-TOFMS) para llevar a cabo la detección y cuantificación de los analitos.

ABSTRACT

In this work, a bibliographic review on the analysis of pesticides and veterinary products in chicken eggs and meat has been carried out. To this end, the most frequently used sample treatment methods for the analysis of organic contaminants in food were reviewed, including solvent-based extraction, solid phase extraction and the QuEChERS method. Regarding the methods of detection and analytical quantification, the different alternatives offered by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS) in the analysis of contaminants in food samples have been compared. From the information retrieved, a method for the analysis of pesticides and veterinary residues in eggs and chicken meat has been envisaged and proposed. It is based on the use of the QuEChERS method as sample treatment followed by the use of liquid chromatography coupled to mass spectrometry with time of flight analyzer (LC-TOFMS) to carry out the detection and quantification of the analytes.

2. OBJETIVOS

Los principales objetivos que pretenden conseguir en este Trabajo de Fin de Grado son los siguientes:

- Realizar un análisis crítico de la bibliografía disponible para el análisis de residuos de pesticidas y productos veterinarios en huevo y carne de pollo, identificando las mejores opciones para el tratamiento de la muestra y para la detección y cuantificación de los analitos mediante LC/MS.
- Proponer un nuevo método para el análisis de pesticidas y productos veterinarios en huevo y carne de pollo, basado en el uso de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, a partir del análisis crítico de la bibliografía consultada.

3. INTRODUCCIÓN

La alimentación es uno de los pilares fundamentales en la vida de las personas, ya que unos hábitos alimenticios inadecuados pueden derivar en diferentes problemas de salud. Es un hecho innegable que la alimentación tal y como se conoce hoy en día presenta muchas diferencias con respecto a la de unos años atrás. Estas diferencias son el resultado de la necesidad de adaptación a los cambios sufridos como consecuencia del desarrollo y la evolución de la vida humana. Un aspecto relevante en el cambio de la alimentación es el aumento demográfico experimentado, el cual exige un mayor rendimiento en la producción de alimentos a fin de poder satisfacer las necesidades de la población. Este mayor rendimiento ha sido posible, en parte, gracias a la incorporación en el sector agroalimentario de una serie de productos químicos que han permitido asegurar la productividad alimentaria. Sin embargo, estos compuestos también presentan unas características inherentes que pueden tener efectos negativos en la salud de las personas, así como en el medio ambiente. Por tanto, se pone de manifiesto la importancia de mantener un control sobre estas sustancias, asegurando la calidad alimentaria y justificando la necesidad del establecimiento de un marco regulatorio que

garantice la seguridad en los diferentes ámbitos relacionados con la producción y el consumo de alimentos.

3.1. Importancia del sector avícola: huevos y carne de pollo

El huevo y la carne de pollo constituyen uno de los elementos básicos en la dieta humana. Ambos productos son ingredientes ampliamente utilizados en la cocina de muy diversos grupos de población debido a las características que presentan, entre las que se encuentran su importante valor nutritivo, facilidad en su preparación, versatilidad, así como su bajo coste económico. Son éstas las razones por las que se han elegido estos alimentos para llevar a cabo el estudio que se plantea.

El huevo se caracteriza por su elevado valor nutritivo, siendo una fuente significativa de proteínas, vitaminas, grasas, minerales, que contribuyen al buen funcionamiento del organismo. De manera general, se pueden diferenciar tres partes en el huevo: la clara y la yema, destinadas para el consumo, y la cáscara, la cual no es apta para el consumo humano. En cuanto a su composición, el huevo está constituido por aproximadamente un 74% de agua, un 12% de proteínas y un 10% de lípidos. Dentro de la fracción lipídica se puede encontrar un 66% de triglicéridos, un 28% de fosfolípidos y un 6% de colesterol (Hildmann *et al.*, 2015). Aunque los huevos de gallina son los más consumidos a nivel mundial, representando un 92% del total (Instituto de Estudios del Huevo, 1996), también es posible el consumo de huevos de otras especies tales como la codorniz o el avestruz.

De acuerdo con el Modelo Europeo de Producción del Huevo, es posible diferenciar cuatro tipos de gallinas en función del sistema utilizado para la cría y el mantenimiento de las mismas: gallinas criadas en jaulas, gallinas criadas en suelo, gallinas camperas y gallinas ecológicas. En España la legislación aplicable en este ámbito se encuentra recogida en el Real Decreto 372/2003, de 28 de marzo, por el que se establece y regula el Registro general de establecimientos de gallinas ponedoras. Según los datos proporcionados por la Organización Interprofesional del Huevo y sus Productos (INPROVO), en el año 2018 en España, el 82% de las gallinas ponedoras fueron criadas en

jaulas, el 9% en suelo, el 7% camperas y un 1% ecológicas. En este mismo año, el consumo de huevos fue de 16,8 kg por persona, lo cual se correspondería con aproximadamente 265 huevos al año. España es una importante potencia exportadora de este producto, donde los principales destinos los constituyen países que forman parte de la Unión Europea, como puede observarse en la Figura 1.



Figura 1. Exportaciones de huevos en España entre los años 2008-2018. (Datos proporcionados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA)).

En lo que respecta a la carne de pollo, ésta es una de las carnes más consumidas a nivel mundial, seguida de la carne de cerdo. Según datos proporcionados por la Fundación Española de Nutrición, en su Guía Nutricional de la Carne (Valero *et al.*, 2017), la composición de la carne de pollo es de 70,3% de agua, 9,7% de lípidos y 20% de proteínas. Su bajo contenido en grasa hace que sea altamente utilizado en la alimentación. España ocupa la segunda posición a nivel europeo en la producción de la carne de pollo, estando concentrada principalmente su producción en Cataluña, Comunidad Valenciana, Andalucía y Galicia. La primera posición a nivel mundial la ocupa EEUU, estando situada España en cuarto lugar con un 12,4% del total.

Puesta de manifiesto la importancia de estos productos en el sector de la alimentación, se justifica la necesidad de establecer unos sistemas de control que garanticen la inocuidad de los mismos y el cumplimiento de la legislación vigente.

3.2. Seguridad alimentaria

El mundo se encuentra en continua evolución y eso ha generado modificaciones en las necesidades y en los hábitos alimenticios. Estos cambios se han visto supeditados a la transformación de las explotaciones agrícolas y ganaderas. El uso de determinados productos químicos como abonos orgánicos, pesticidas, herbicidas, productos veterinarios, etc., se considera como algo habitual en el sector agroalimentario actual. Sin embargo, los residuos de estos productos químicos en los alimentos obtenidos, pueden suponer un riesgo para la salud del consumidor. Surge entonces la conocida como seguridad alimentaria, la cual tiene como objetivo la protección del consumidor garantizando la inocuidad de los alimentos. Para ello existen diferentes instituciones, las cuales se pueden encontrar a diferentes niveles de organización como pueden ser nivel internacional, europeo o estatal. En un contexto internacional, algunas de las organizaciones que velan por la consecución de esos objetivos son la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Ambas instituciones han contribuido en la elaboración de un Programa Conjunto OMS/FAO sobre normas alimentarias a nivel internacional conocido como “Codex Alimentarius” o “Código alimentario”. A nivel europeo, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) es la encargada del control y el asesoramiento sobre los posibles riesgos relacionados con los alimentos entre los diferentes miembros de la UE. La EFSA también colabora con otras organizaciones europeas encargadas del control de la salud y seguridad de seres humanos, animales y medioambiente, como la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), la Agencia Europea de Medio Ambiente (AEMA) o la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA). En el ámbito estatal, cabe destacar la importancia de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), cuyo objetivo es preservar la seguridad de los consumidores mediante el establecimiento de un sistema de redes de alerta alimentaria, donde esta entidad se constituye como el centro de comunicación entre las diferentes redes de alerta disponibles.

3.3. Clasificación de contaminantes en alimentos

Son múltiples los contaminantes que pueden encontrarse en los alimentos, lo cual hace que sea imprescindible mantener estas sustancias por debajo de unos límites que garanticen su inocuidad para la salud de los consumidores. Algunos de los contaminantes a los que se hace referencia son: pesticidas, productos veterinarios, micotoxinas, metales, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), contaminantes orgánicos persistentes (COP), etc.

3.3.1. Clasificación de productos veterinarios

Teniendo en cuenta el objetivo de este trabajo, se va a realizar una clasificación de los diferentes tipos de fármacos de uso veterinario y cuyos residuos es posible encontrar en los alimentos. La legislación aplicable a estos productos es el Reglamento (CE) N° 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, en el que quedan definidos los residuos de medicamentos veterinarios como “todas las sustancias farmacológicamente activas, expresadas en mg/kg o µg/kg sobre la base del peso en fresco, ya sean sustancias activas, excipientes o productos de degradación, y sus metabolitos que permanezcan en los alimentos obtenidos a partir de animales”.

Una clasificación de estos compuestos queda definida en el Anexo I del Real Decreto 1749/1998. Se establecen dos grupos diferenciados, el grupo A, y el grupo B. El grupo A, recogido en la tabla 1, incluye la mayor parte de las sustancias cuyo uso no está permitido por la Unión Europea en animales destinados a la producción de alimentos.

Tabla 1. Clasificación de sustancias contenidas en el Grupo A según R.D. 1749/1998

Grupo A. Sustancias con efecto anabolizante y sustancias no autorizadas

1. Estilbenos, derivados de los estilbenos, sus sales y ésteres
2. Agentes antitiroideos
3. Esteroides
4. Lactonas de ácido resorcílico (incluido Zeranol)
5. β-agonistas
6. Sustancias incluidas en el anexo IV del Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo, de 26 de junio

Por el contrario, el uso de buena parte de los medicamentos veterinarios contenidos en el grupo B, recogidos en la tabla 2, sí está permitido de acuerdo con lo establecido en el Reglamento (UE) N° 37/2010.

Tabla 2. Clasificación de sustancias contenidas en el Grupo B según R.D. 1749/1998

Grupo B. Medicamentos veterinarios y contaminantes	
1. Sustancias antibacterianas, incluidas las sulfamidas y las quinolonas	
2. 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	
3. Otras sustancias y contaminantes medioambientales	
a) Compuestos organoclorados, incluidos los PCB	
b) Compuestos organofosforados	
c) Elementos químicos	
d) Micotoxinas	
e) Colorantes	
f) Otros	

Es por este motivo por el que las sustancias pertenecientes al grupo B son las que protagonizan la mayoría de los estudios realizados sobre el control de contaminantes en alimentos. En la tabla 3 se puede observar una clasificación más detallada de los medicamentos veterinarios, atendiendo a su funcionalidad.

Tabla 3. Clasificación de medicamentos veterinarios incluidos en el Grupo B

Clase	Campo de aplicación	Ejemplos
Antihelmínticos	Tratamiento de infecciones provocadas por parásitos llamados helmintos	Lactonas macrocíclicas Benzimidazoles
Anticoccidianos	Tratamiento de una infección parasitaria conocida como coccidiosis	Coccidiostáticos Coccidicidas
Antiinflamatorios no esteroideos	Destinados a evitar o reducir la inflamación de los tejidos	Ácidos No ácidos
Antibióticos	Destinados a combatir infecciones originadas por bacterias	Tetraciclinas Quinolonas Macrólidos

3.3.2. Clasificación de pesticidas

La FAO define pesticida como “cualquier sustancia o mezclas de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga” (FAO, 2003). Como se ha comentado anteriormente, es posible encontrar varias clasificaciones de estos productos. Una de ellas es la basada en la funcionalidad de los diferentes pesticidas, la cual queda recogida en la Tabla 4.

Tabla 4: Clasificación según la función de los pesticidas (Ware, 1983).

Tipo de pesticidas	Campo de aplicación
Insecticidas	Insectos
Molusquicidas	Moluscos
Nematicidas	Nematodos
Acaricidas	Ácaros
Rodenticidas	Roedores
Avicidas	Aves
Herbicidas	Maleza
Fungicidas y bactericidas	Hongos y bacterias
Algicidas	Algas

Otra clasificación que utiliza como criterio la toxicidad los pesticidas es la realizada por la OMS, la cual está basada en la toxicidad aguda oral y dérmica para la rata, ya que estas determinaciones son procedimientos estándar en toxicología. Para ello se va a hacer uso del valor DL_{50} , que es una estimación estadística de la dosis de una sustancia que resulta letal para el 50% de la población de animales de prueba (Dosis Letal Media).

Tabla 5. Clasificación según la toxicidad de los plaguicidas (OMS, 2010)

Clase	DL_{50} (mg/kg peso corporal)			
	Vía oral		Vía dérmica	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Ia. Extremadamente peligrosos	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
Ib. Altamente peligrosos	5-50	20-200	10-100	40-400
Ic. Moderadamente peligrosos	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
Id. Ligeramente peligrosos	> 500	> 2000	> 1000	> 4000

3.4. Límite máximo de residuos en pesticidas y productos veterinarios

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, 2003). A nivel internacional existen varios organismos encargados del establecimiento de los LMRs. La principal fuente internacional de LMR es el *Codex Alimentarius* (*Codex Alimentarius*, FAO-OMS), la cual fija estos valores en base a la organización conjunta FAO y OMS. El Departamento de Agricultura de Estados Unidos, en colaboración con la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (USFDA), también cuenta con una base de datos de LMRs (*Maximum Residue Limits Database*, *USDA Foreign Agricultural Service*), al igual que la Unión Europea (*UE Pesticides Database*). Por tanto, aunque existan organismos que establezcan LMRs de uso internacional, pueden observarse diferencias en estos valores en función de la legislación consultada.

En la Unión Europea estos LMRs se establecen tomando como base las conclusiones obtenidas en un informe de evaluación realizado por un estado miembro de la Unión Europea. En este informe se tienen en cuenta distintos aspectos, realizándose en primer lugar una definición de la estructura y propiedades químicas de la sustancia en cuestión. Ensayos toxicológicos de la sustancia permiten fijar determinados parámetros que van a caracterizar el factor de peligro, como son la Ingesta Diaria Admisible (IDA) o la Dosis de referencia aguda (DRfA). Esto permite analizar el nivel de exposición a la sustancia en cuestión, realizando una comparación de la cantidad de residuos encontrados en alimentos con modelos de exposición hipotética de la población a estos residuos. En el caso de que estos valores toxicológicos no superen la IDA o DRfA, se continúa el proceso de fijación de los LMRs propuestos. En el siguiente paso el informe de evaluación realizado es enviado a la EFSA, siendo ésta la responsable de publicar un juicio público acerca de los riesgos de la sustancia en cuestión. La resolución favorable por parte de la EFSA supone una garantía del cumplimiento de seguridad alimentaria para todos los miembros de la Unión Europea. Finalmente, el nuevo LMR es establecido por la Comisión Europea en base al informe aprobado por la EFSA, el cual queda

recogido en un Reglamento Europeo, pasando a formar parte de la base de datos que recoge los LMRs (*UE Pesticides Database*).

Los LMRs para residuos de plaguicidas se establecen en el Reglamento (CE) N° 149/2008 de la Comisión, de 29 de enero de 2008, por el que se modifica el 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. Para el caso de productos veterinarios se recurre al 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. El Reglamento (CE) N°1881/2006 fija el contenido máximo de otros contaminantes en productos alimenticios.

Por otra parte, para determinar si un alimento cumple con los LMRs establecidos, se debe garantizar la calidad de los resultados analíticos obtenidos por parte de los laboratorios autorizados para el control oficial de residuos en alimentos. Para ello es recomendable recurrir a métodos oficiales, los cuales han sido sometidos a un proceso de validación de acuerdo con lo establecido por la Decisión de la Comisión 2002/657/EC, en la que se establecen los procedimientos para la validación de métodos a nivel europeo. Esta normativa, relativa al funcionamiento de los métodos analíticos para la determinación de contaminantes en alimentos y la interpretación de los resultados, indica el empleo de una técnica cromatográfica como mejor método analítico, incluyendo la cromatografía de líquidos y la cromatografía de gases. De hecho, la UE determina que el mejor método analítico para la determinación de estas sustancias es la cromatografía en combinación con la espectrometría de masas como sistema de detección. En este contexto también es necesario tener en cuenta lo establecido en la guía SANTE/12682/2019, destinada a los laboratorios involucrados en el control oficial de residuos de pesticidas en alimentos y piensos en toda la Unión Europea. Este documento incluye los requisitos necesarios para la validación del método y el control de calidad analítico, justificando la validez de los resultados obtenidos por parte de los controles oficiales. Dentro de los criterios a los que se hace referencia se

incluye la sensibilidad, especificidad, efecto matriz, robustez, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), entre otros.

3.4.1. Límites máximos de residuos y alertas sanitarias en huevo y pollo

A continuación, se va a presentar una selección representativa de pesticidas y productos veterinarios regulados en huevo y carne de pollo, incluyendo sus LMRs establecidos por el Codex, la Unión Europea y la USFDA. Para ello se han seleccionado algunos de los compuestos más frecuentemente analizados en los estudios recientes, incluyendo varios de diferentes familias. Los pasos seguidos en este proceso quedan recogidos en la Figura 2.



Figura 2. Diagrama de flujo seguido para la selección representativa de analitos

Una vez completada la selección de los analitos, se han recogido los LMRs de dichos compuestos según el Codex, la Unión Europea y la USFDA con objeto de someterlos a un análisis comparativo y observar las diferencias existentes entre los diferentes organismos reguladores.

Tabla 6. LMRs establecidos por el Codex, UE y USFDA para una selección de analitos

	Compuesto ⁽¹⁾	Clase	LMR Codex (mg/kg)		LMR UE (mg/kg)		LMR USFDA (mg/kg)	
			Huevo	Pollo ⁽²⁾	Huevo	Pollo ⁽²⁾	Huevo	Pollo ⁽²⁾
1	Ampicillin	Fármaco			0	0,05		
2	Acephate	Pesticida	0,01			0,02*	0,1	0,1
3	Acetamiprid	Pesticida	0,01			0,02		
4	Aclonifen	Pesticida				0,01*		
5	Alachlor	Pesticida				0,01*	0,02	0,02
6	Amitrole	Pesticida				0,05*		
7	Carbofuran	Pesticida				0,01*		
8	Chlortetacycline	Fármaco			0,2	0,1		

Tabla 6. (continuación)

	Compuesto ⁽¹⁾	Clase	LMR Codex (mg/kg)		LMR UE (mg/kg)		LMR USFDA (mg/kg)	
			Huevo	Pollo ⁽²⁾	Huevo	Pollo ⁽²⁾	Huevo	Pollo ⁽²⁾
9	Cloxacillin	Fármaco			0	0,3		
10	Danofloxacin	Fármaco		0,2	0	0,2		
11	Diclazuril	Fármaco			0	0,5		
12	Difloxacin	Fármaco			0	0,3		
13	Disulfoton	Pesticida	0,02			0,02		
14	Enrofloxacin	Fármaco			0	0,1		
15	Erythromycin	Fármaco	0,05	0,1	0,15	0,2		0,125
16	Fenbendazole	Fármaco			1,3	0,05		
17	Fenthion	Pesticida				0,01*		
18	Fipronil	Pesticida	0,02	0,01	0,005*	0,005*	0,03	0,02
19	Flumequine	Fármaco		0,5	0	0,4		
20	Fluralaner	Fármaco			1,3	0,065		
21	Sarafloxacin	Fármaco		0,01	0			
22	Spinosad	Pesticida	0,01			0,2	0,3	0,1
23	Spiramycin	Fármaco		0,2	0	0,2		
24	Spirotetramat	Pesticida	0,01			0,01*	0,02	0,02
25	Sulfadimethoxine	Fármaco			0	0,1		0,1
26	Sulfamethazine	Fármaco			0	0,1		0,1
27	Sulfamethizole	Fármaco			0	0,1		
28	Sulfanilamide	Fármaco			0	0,1		
29	Sulfapyridine	Fármaco			0	0,1		
30	Sulfaquinoxaline	Fármaco			0	0,1		0,1
31	Sulfathiazole	Fármaco			0	0,1		
32	Terbutylazine	Pesticida				0,05*		
33	Thiabendazole	Pesticida	0,1			2		
34	Tiamphenicol	Fármaco			0	0,5		
35	Tilmicosin	Fármaco		0,15	0	0,075		

(*) Indica el límite inferior de determinación analítica

(1) Nombres de fármacos y plaguicidas en inglés

(2) LMRs en músculo de pollo

Como puede observarse en la tabla anterior, existen diferencias notables entre los LMRs establecidos por los diferentes organismos reguladores. Analizando los LMRs europeos respecto a los establecidos por el *Codex* o por Estados Unidos, se pone de manifiesto el carácter más restrictivo por parte de la UE. Un ejemplo de ello puede observarse en el caso del fipronil, donde la UE establece un valor de 0,005 mg/kg tanto en huevo como en carne de pollo, mientras que la USFDA y el *Codex* establecen valores superiores en ambos alimentos. Otro ejemplo destacable es el caso de las sustancias pertenecientes al grupo de las sulfonamidas, para las que la UE establece un LMR de 0,01 mg/kg en tejidos diana de animales productores de alimentos (músculo, riñón, hígado, etc.), mientras que no está autorizado su uso en animales que producen huevos para

el consumo humano, a diferencia de lo establecido por el *Codex* y la USFDA. En el caso de España se aplica la política establecida por la UE.

En los productos alimentarios derivados del sector avícola es posible encontrar residuos de fármacos, debido a su uso para el tratamiento de determinadas enfermedades, así como residuos de pesticidas, los cuales pueden llegar a los animales a través del pienso utilizado en su alimentación. No obstante, también hay situaciones en las que el uso de estos productos químicos es muy limitado o nulo, como es el caso de las gallinas ecológicas, donde no debería encontrarse la presencia de ninguno de estos residuos en ellas. Por tanto, se pone de manifiesto la necesidad de regular la presencia de estos compuestos, siendo de vital importancia el conocimiento de la fuente a través de la cual pueden aparecer en los alimentos.

Sin embargo, a pesar de la presencia de estas instituciones reguladoras, hay ocasiones en las que no se cumple con lo establecido en la legislación, dando origen a las conocidas como alertas sanitarias. Un ejemplo de ello es la crisis alimentaria que afectó a Europa en 2017 debido a la identificación de fipronil en huevos en cantidades superiores a las permitidas por la legislación. Esta alerta tuvo su epicentro en Bélgica y Holanda, donde fueron detectadas las primeras partidas de huevos contaminados, sin embargo, la rápida actuación de los sistemas de alerta alimentaria hizo crecer la voz de alarma y hasta un total de 40 países se vieron involucrados. Según un informe realizado por la Dirección General de Salud y Seguridad alimentaria de la Unión Europea, los niveles de fipronil detectados fueron de 0,72 mg/kg en huevos y de 0,77 mg/kg en carne de pollo, llegando a alcanzar un valor de 1,2 mg/kg en huevos producidos en Bélgica durante esta crisis (Tu *et al.*, 2018). El LMR actual de fipronil en huevos y músculo de aves de corral establecido por el *Codex* es de 0,02 mg/kg, estableciendo la UE un límite más estricto de 0,005 mg/kg.

Tras esta crisis alimentaria la alarma social fue evidente y una de las cuestiones que generaban mayor preocupación era la capacidad de los laboratorios oficiales para poder detectar la presencia de fipronil en huevos. Por tanto, se pone de manifiesto la necesidad de actualizar continuamente los

métodos analíticos que permitan la detección de nuevos compuestos, bien porque se haya autorizado su uso para un determinado alimento, o bien porque se haya hecho uso de pesticidas o productos veterinarios no autorizados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Son múltiples los estudios realizados que se centran en el análisis de sustancias contaminantes en huevo y carne de pollo. Debido a esta gran diversidad, se realizó una búsqueda bibliográfica con objeto de conocer los distintos procedimientos de tratamiento de muestra y métodos de análisis aplicados en estos estudios, comparando las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos. Esta información va a permitir realizar la propuesta de un nuevo método de análisis que incluya la mayor cantidad posible de analitos regulados en carne de pollo y en huevo y que sea lo más eficiente posible. Los pasos seguidos para la ejecución de la búsqueda realizada quedan desarrollados en un diagrama de flujo, recogido en la Figura 3.

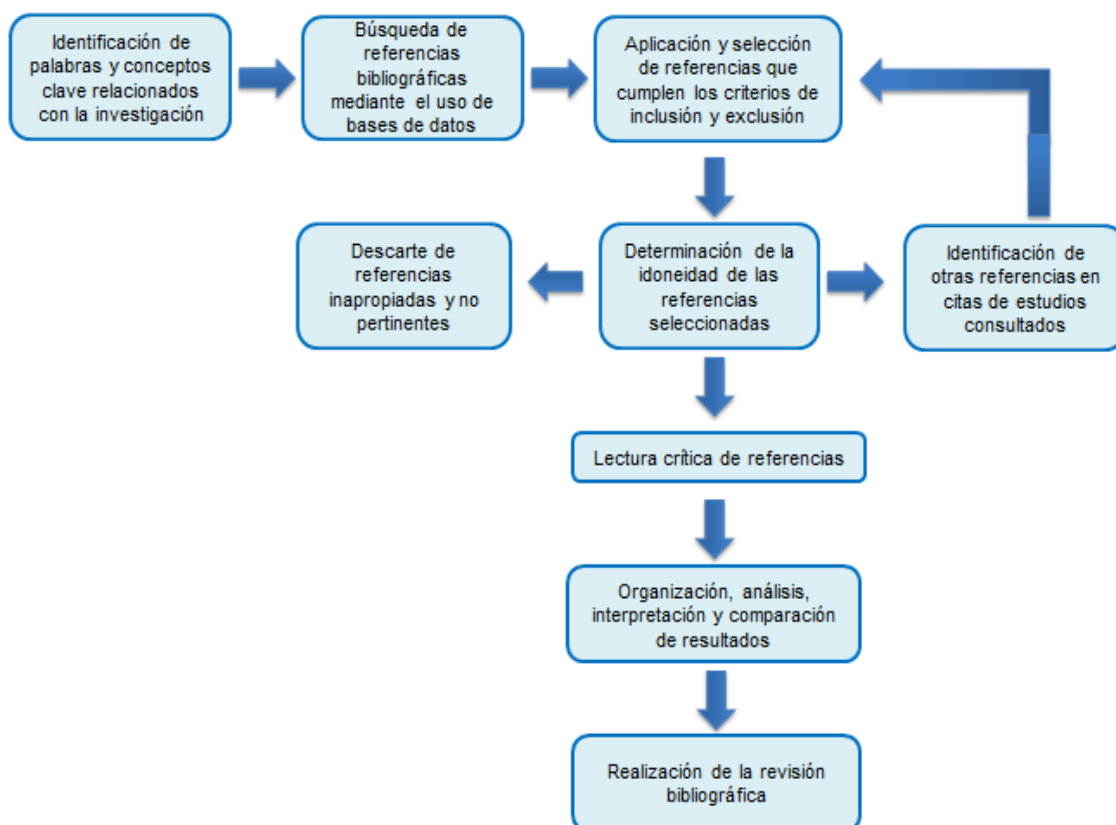


Figura 3. Diagrama de flujo para la realización de una revisión bibliográfica.

Para llevar a cabo la búsqueda bibliográfica han sido utilizadas tres bases de datos diferentes: *Web of Science (WOS)*, *Scopus* y *ScienceDirect*. Las bases *Web of Science* (propiedad de *Clarivate Analytics*) y *Scopus* (propiedad de *Elsevier*) son las dos principales bases de datos mundiales de referencias bibliográficas. En el caso de *ScienceDirect*, esta base de datos también pertenece a la editorial *Elsevier*, sin embargo, su contenido es menor que el que se puede encontrar en *Scopus* ya que solo realiza la búsqueda entre las publicaciones de esta editorial.

El primer paso para llevar a cabo la búsqueda bibliográfica es establecer una serie de criterios, los cuales van a permitir refinar las referencias obtenidas en función del grado de especificidad. Dentro de estos criterios se incluye el empleo de palabras clave relacionadas con el tema de estudio, nombre del autor, año de publicación, idioma, tipo de publicación, etc. Junto con estos criterios también es importante la sintaxis utilizada para realizar la búsqueda. Es muy frecuente en las búsquedas bibliográficas el uso de los conocidos como operadores *booleanos*, los cuales son una serie de palabras o símbolos que van a permitir aumentar la eficacia de la búsqueda.

En el caso concreto de este estudio, se elaboró en primer lugar una búsqueda bibliográfica basada en el uso de conceptos relacionados con el tema de estudio. Para ello la búsqueda se realizó en inglés, ya que el número de publicaciones en este idioma es mucho más elevado; y se fijó como periodo de tiempo el intervalo comprendido entre los años 2009 y 2019. Entre los campos de búsqueda se incluyeron el título, resumen y palabras clave.

La sintaxis utilizada para la búsqueda fue: *(egg* OR chicken) AND (pesticide* OR veterinary drug*) AND LC/MS*. El operador *OR* permite obtener aquellas referencias que incluyan cualquiera de los términos que separa. El operador *AND* incluye las referencias que contengan los términos entre los que está situado. El operador *** permite obtener las diferentes formas del término que lo contiene, es decir, incluye las referencias que contengan tanto el término *egg* como *eggs*. Los resultados obtenidos quedan recogidos en la Tabla 7.

Tabla 7. Número de referencias obtenidas con las diferentes bases de datos utilizadas

Bases de datos	Referencias
<i>Web of Science (WOS)</i>	172
<i>Scopus</i>	123
<i>ScienceDirect</i> ^[1]	31

[1] No permite el uso del operador *

Tal y como se ha comentado anteriormente, se obtiene un mayor número de referencias con el uso de las bases *WOS* y *Scopus*, siendo ambas un importante referente a nivel mundial. A continuación se realizó un análisis más exhaustivo de los resultados obtenidos haciendo uso de la base *WOS*.

Un aspecto interesante a tener en cuenta cuando se realiza una búsqueda bibliográfica es el tipo de publicación al que se hace referencia, pudiendo ser artículos de investigación, artículos de revisión, capítulos de libros, etc. Analizando el tipo de publicaciones obtenidas, se obtiene que de las 172 publicaciones encontradas, 160 son artículos de investigación, 5 son artículos de revisión, 1 pertenece a capítulos de libros, 3 son documentos de procedimiento y 3 pertenecen a otras categorías. Como puede observarse, los artículos de investigación son los más frecuentemente publicados dentro de las referencias obtenidas en esta búsqueda, representando el 93% de las publicaciones totales.

Otro de los aspectos que se tuvieron en cuenta fue el número de referencias publicadas entre los años 2009-2019, utilizando para ello la misma sintaxis que la descrita anteriormente. Los resultados obtenidos quedan recogidos en la Figura 4.

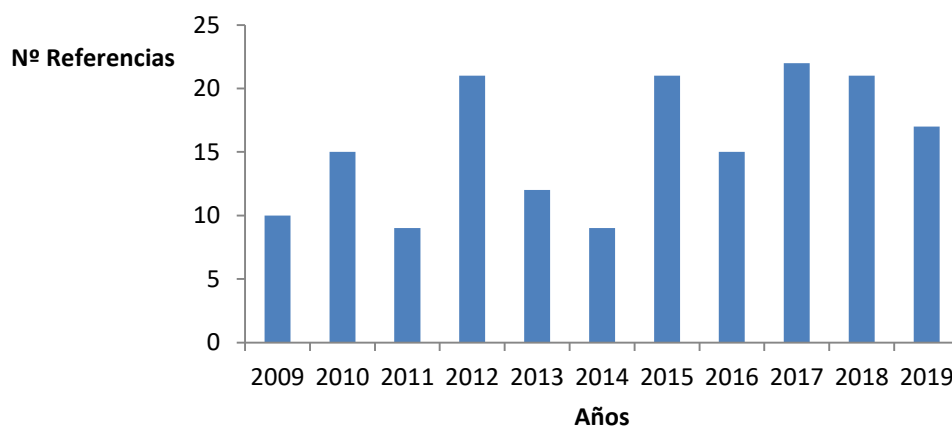


Figura 4. Referencias publicadas durante los años 2009-2019

Un total de 172 referencias publicadas entre los años 2009 y 2019 aparece en la base de datos WOS. Si se extiende este análisis a los últimos 20 años, el número de referencias obtenido asciende a 197. Comparando los resultados obtenidos en ambos periodos de tiempo se puede ver claramente cómo el número de publicaciones ha aumentado con el paso del tiempo, representando el número de referencias publicadas entre 2009-2019 un 87% del total de publicaciones de los últimos 20 años. Esto puede justificarse a partir de varios motivos, tales como la mejora y el surgimiento de nuevas técnicas analíticas, las cuales han posibilitado la ejecución de nuevos estudios con mayores garantías y fiabilidad, así como la creciente importancia que ha adquirido la seguridad alimentaria en los últimos años, llegando a convertirse en una cuestión fundamental en la vida moderna.

Una vez concluida la búsqueda siguiendo los pasos descritos en la Figura 3, se realizó una selección representativa de referencias que constituyen la base de esta revisión bibliográfica. Para ello se hizo uso del gestor de referencias *EndNote*, el cual permite gestionar fácilmente las publicaciones obtenidas a partir de diferentes bases de datos. En primer lugar, se exportaron las referencias obtenidas en las tres bases de datos anteriormente comentadas, obteniendo un total de 326 referencias. A continuación se eliminaron las referencias duplicadas, quedando un total de 233 publicaciones en los últimos 10 años. Seguidamente se realizó un análisis de las referencias restantes organizándolas en varios grupos en función de palabras clave contenidas en su título, lo cual permitió eliminar algunas de ellas que no se consideraban relevantes para este estudio. Finalmente, tras llevar a cabo todo este proceso se seleccionó un total de 70 referencias, a partir de las cuales se realizó una recopilación representativa, la cual queda recogida en la Tabla 8. Esta selección se llevó a cabo tratando de poner como ejemplo la variedad de tratamientos de muestra y sistemas de análisis que es posible encontrar en el estudio de pesticidas y productos veterinarios en huevo y carne de pollo, y sobre los que posteriormente se realizará una descripción más detallada.

Tabla 8. Selección de referencias basadas en el análisis de pesticidas y productos veterinarios en huevo y carne de pollo

Número Analitos	Analitos	Muestra	Extracción	Purificación (Clean up)	Determinación	Ref.
76	Productos veterinarios Pesticidas	Huevos	QuEChERS Na ₂ EDTA + ACN (1% HAc) + Na ₂ SO ₄ + NaCl	d-SPE: C ₁₈ + PSA Evaporación en corriente de N ₂ Reconstitución en MeOH:H ₂ O (50:50 v/v) Filtración en filtro PTFE 0,22µm	HPLC-QTOF-MS	(Hou <i>et al.</i> , 2020)
30	Productos veterinarios	Carne de pollo	QuEChERS H ₂ O + EDTA + ACN (1% HAc) + MgSO ₄ + NaCl	d-SPE: C ₁₈ + PSA + MgSO ₄ Evaporación en corriente de N ₂ Reconstitución en H ₂ O:ACN (70:30 v/v) Filtración en filtro PVDF 0,45µm	LC-QQQ-MS/MS	(Jammoul y El Darra, 2019)
6	Pesticidas	Carne de pollo Carne de cerdo Huevos	QuEChERS ACN (1% HAc) + MgSO ₄ + NaAc	Reextracción con ACN (1% AcH) d-SPE: C ₁₈ + PSA Evaporación del disolvente Reconstitución en NH ₄ Ac:MeOH	UHPLC-QQQ-MS/MS	(Rahman <i>et al.</i> , 2016)
120	Productos veterinarios Aditivos para piensos Colorantes	Huevos	LLE Ác.Fórmico 0,1% en ACN:H ₂ O (8:2) + EDTA	SPE (Cartuchos híbridos SPE) Preacondicionamiento: 200µL ác.fórmico 0,1% en ACN + 1mL ác.fórmico 0,1% en ACN	LC-QQQ-MS/MS	(Piatkowska <i>et al.</i> , 2015)
115	Productos veterinarios	Leche en polvo Mantequilla Tejido de pescado Huevos	LLE Ác. Fórmico 0,1% en solución acuosa de EDTA 0,1% (p/v) – ACN –MeOH (1:1:1, v/v) Extracción adicional asistida por ultrasonidos	Fraccionamiento con hexano	LC-ESI-MS/MS	(Dasenaki y Thomaidis, 2015)
43	Productos veterinarios	Carne de pollo	LEE ACN:H ₂ O (4:1)	d-SPE: C ₁₈ Dilución con agua destilada Filtración con filtro PTFE	UHPLC-MS/MS	(Yamaguchi <i>et al.</i> , 2015)

Tabla 8. (continuación)

Número Analitos	Analitos	Muestra	Extracción	Purificación (Clean up)	Determinación	Ref.
104	Productos veterinarios Micotoxinas	Huevos Leche	QuEChERS Ác. Fórmico en ACN (3.35% (v/v)) + NaCl + NaAc anhidro + Na ₂ SO ₄ anhidro + PSA	d-SPE: C₁₈ Evaporación en corriente de N ₂ Reconstitución en ACN:H ₂ O (20:80, v/v) Filtración en filtro PTFE 0,2µm	UHPLC-MS/MS	(Zhou et al., 2018)
41	Productos veterinarios	Huevos	PLE ACN + Tampón ác. Succínico (pH=6) (1:1 v/v) (70°C)	No clean up	UHPLC-MS/MS	(Jiménez et al., 2011)
8	Pesticidas	Carne de pollo	QuEChERS H ₂ O + Acetona + NaCl + Na ₃ -citrato·2H ₂ O + Na ₂ H-citrato·1,5H ₂ O + MgSO ₄ anhidro	SPE 1) Cartucho Smart-SPE ZAX-50 mg + Smart-SPE PSA-30 mg 2) Cartucho (Smart-SPE C18-50 mg)	LC-MS/MS	(Hamamoto et al., 2017)
43	Productos veterinarios	Carne de pollo	QuEChERS H ₂ O + ACN (1% Ac. Fórmico) (Método A) ó ACN (Método B) + MgSO ₄ + Na ₃ -citrato·2H ₂ O + NaCl	No clean up	LC-QQQ-MS/MS	(Nakajima et al., 2012)
87	Productos veterinarios	Huevos	SOSLE Tampón de extracción (Ác.oxálico + NH ₄ OH + Na ₂ EDTA) + MeCN + (NH ₄) ₂ SO ₄	SPE: Oasis HLB Preacondicionamiento: MeOH + H ₂ O + Tampón de extracción	NanoLC-HRMS	(Alcántara-Durán et al., 2018)
126	Pesticidas	Carne de pollo	QuEChERS ACN + Mg ₂ SO ₄ + NaCl + Na ₃ -citrato·2H ₂ O + Na ₂ H-citrato·1,5H ₂ O	dSPE: EMR-Lipid Centrifugación: 5000 rpm (5 min) Sobrenadante: Mg ₂ SO ₄ + NaCl Centrifugación: 5000 rpm (5min) Dilución en agua Filtración con filtro PTFE	UHPLC-QTOF-MS/MS	(Weng et al., 2019)

5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PESTICIDAS Y PRODUCTOS VETERINARIOS EN HUEVO Y CARNE DE POLLO

Un método de análisis químico consta de varias etapas como son la planificación, obtención de la muestra, preparación de la muestra, medida y tratamiento y evaluación de los resultados. En este trabajo se va a realizar una discusión crítica de los métodos de análisis de residuos en huevo y carne de pollo centrada en dos de las etapas mencionadas anteriormente, que son el tratamiento de muestra y la técnica de determinación. En cuanto a la segunda etapa, según las recomendaciones de uso de técnicas cromatográficas de la Directiva 2002/657/EC y la guía SANTE/12682/2019, mencionadas en el apartado 3.4 de esta memoria, se va a realizar un análisis comparativo de los métodos basados en cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.

5.1. Tratamiento de muestra en huevo y carne de pollo

La etapa de tratamiento de muestra es una de las fases más importantes a lo largo del proceso analítico, ya que de ella va a depender la eficacia del análisis. Un factor que pone de manifiesto su importancia, es que el desarrollo de esta etapa suele consumir la mayor parte del tiempo dedicado al proceso de análisis. El principal objetivo que se pretende alcanzar es la extracción de los analitos de la matriz objeto de estudio. De manera general, la etapa de extracción se realiza en combinación con una fase de purificación o “*clean-up*”. Esta última tiene como finalidad la eliminación de interferencias que puedan alterar los resultados del análisis, así como la preconcentración de los analitos, a fin de conseguir una concentración adecuada para su determinación.

En el caso del análisis de alimentos, hay que tener presente que los compuestos que se pretenden analizar se deben encontrar en cantidades muy pequeñas, a nivel de trazas, ya que su presencia se encuentra regulada por los diferentes organismos bajo unos LMRs muy estrictos. Esto requiere el uso de

técnicas de análisis que permitan la detección de compuestos a esas concentraciones, por lo que es fundamental la selección de un método adecuado que satisfaga las necesidades analíticas para los diferentes tipos de muestras, así como los distintos tipos de compuestos a analizar.

5.1.1. Extracción con disolventes: Líquido-Líquido (LLE) y Sólido-Líquido (SLE)

Una de las técnicas más empleadas por su mayor sencillez es la extracción con disolventes, utilizada mayoritariamente en la extracción de compuestos orgánicos presentes en muestras de naturaleza acuosa. Se basa en la diferente solubilidad de un analito entre dos fases inmiscibles entre sí, y está caracterizada por el conocido como coeficiente de distribución o de reparto (Chen *et al.*, 2008). Este coeficiente informa de la relación de concentraciones del analito en cada uno de los disolventes utilizados, a una temperatura dada. El fundamento de esta técnica se basa en la agitación de la muestra con un disolvente o mezcla de disolventes por los que el analito presente afinidad, al tiempo que sean inmiscibles con la matriz de la muestra. De esta manera se va a conseguir la transferencia del analito desde la matriz hasta el disolvente de extracción, obteniéndose así dos fases que permiten el aislamiento de una u otra fase, en función de los requerimientos analíticos (Nováková y Vlčková, 2009). Durante la fase de agitación es importante conseguir el máximo contacto entre la muestra y el disolvente de extracción, haciendo que la transferencia de los compuestos de interés al disolvente sea lo más efectiva posible. Existen algunos factores que van a ser determinantes en la eficacia de la extracción como son el disolvente empleado y el pH del medio.

En lo referente al disolvente utilizado, su selección va a depender de las características de los analitos que se pretendan extraer, siendo necesario que tanto el disolvente como los compuestos de interés presenten una polaridad similar. Además de la naturaleza de los analitos, también es importante tener en cuenta el tipo de matriz sobre el que se quiere realizar la extracción.

Por lo que respecta al análisis de residuos veterinarios, uno de los principales problemas de estas sustancias en huevo, es la unión de los fármacos a las

lipoproteínas y los disolventes de extracción, dando lugar a la formación de emulsiones y espumas (Frenich *et al.*, 2009). Por este motivo, se pone de manifiesto la necesidad de un disolvente que permita la eliminación de las proteínas. El acetonitrilo (MeCN) suele ser el disolvente más frecuentemente empleado para llevar a cabo la extracción, ya que permite una desnaturalización completa de las proteínas y minimiza la extracción de interferencias (Chiaochan *et al.*, 2010). El metanol no constituye uno de los mejores disolventes de extracción para el caso de muestras de huevo ya que, debido a su elevado contenido lipídico y proteico, produce una insuficiente desnaturalización de las proteínas (Mol *et al.*, 2008). También hay autores que afirman que el uso de metanol no es adecuado ya que puede ocasionar la degradación de distintos analitos, tales como varios tipos de penicilinas (Moretti *et al.*, 2015). En el caso de la carne de pollo, debido a su menor contenido graso, sí es posible obtener buenos resultados con el uso de metanol para la extracción de los analitos (Chico *et al.*, 2008). Otros establecen que, aunque el acetonitrilo es el más frecuentemente utilizado, también presenta algunos inconvenientes ya que no permite una extracción efectiva de compuestos con alta polaridad, así como determinados analitos, entre los que se encuentran las tetraciclinas, que tienden a formar complejos de coordinación (Berendsen *et al.*, 2013). Es por este motivo por el numerosos estudios no utilizan el acetonitrilo puro, sino que lo utilizan en combinación con otros disolventes, como mezclas acetonitrilo:agua (Cao *et al.*, 2018; Piatkowska *et al.*, 2015; Yamaguchi *et al.*, 2015).

El otro parámetro importante a tener en cuenta es el pH del medio extractante, ya que en función de los analitos a extraer será necesario un determinado ajuste de pH. En el caso de productos veterinarios, hay autores que afirman que el uso de ácidos puede mejorar la eficacia de extracción (Zhang *et al.*, 2018). En este estudio se hace un análisis de la influencia del pH en la eficacia de extracción, empleando para ello diferentes porcentajes de ácido acético (0,5%, 1% y 1,5%) en combinación con acetonitrilo. Los resultados obtenidos muestran que las recuperaciones usando ácido acético al 1% son mejores que para el de 0,5%. Se seleccionó como mejor opción la solución al 1% ya que para el caso del ácido al 1,5% los porcentajes de recuperación disminuyeron

ligeramente para algunos analitos como las fluoroquinolonas, mientras que la mayoría de los analitos no presentaban diferencias con respecto a la del 1%. Para el caso de pesticidas también hay autores que confirman lo dicho anteriormente. En un estudio sobre análisis de pesticidas en huevo (Zhang *et al.*, 2019) se hace una comparación de la eficacia del acetonitrilo cuando se combina con otros disolventes para llevar a cabo la extracción. Para ello realiza el análisis con tres mezclas de disolventes: acetonitrilo (1% ác. fórmico), agua/acetonitrilo (1% ác. fórmico), acetonitrilo/agua. Comparando los efectos de cada una de las mezclas extractantes, en la Figura 5 se observa cómo la mezcla de agua y acetonitrilo acidificado muestra los mejores resultados de extracción, seguida de la disolución de acetonitrilo acidificado, debido a que la mayoría de los pesticidas son ácidos y ante estas condiciones se consigue una mejor desnaturalización de las proteínas.

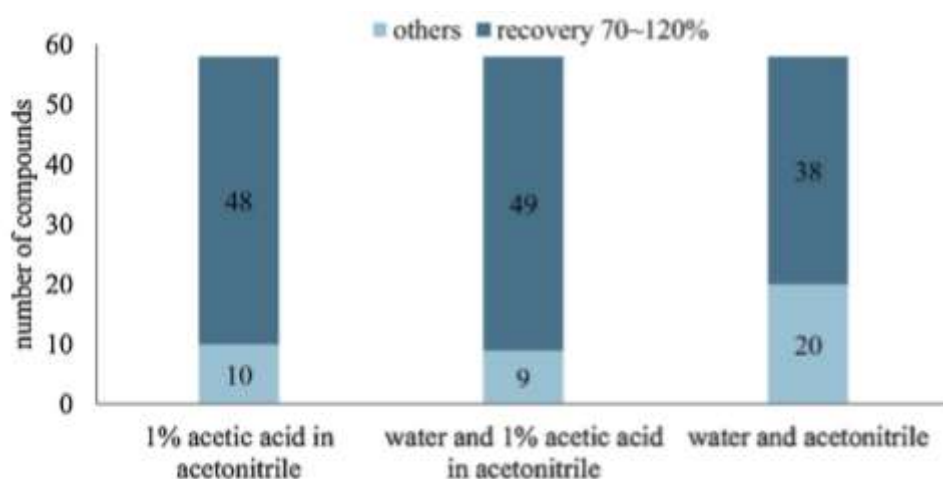


Figura 5. Comparación del porcentaje de recuperación de pesticidas en función del tipo de mezcla extractante (Zhang *et al.*, 2019)

La extracción con disolventes constituye una técnica que ha sido ampliamente utilizada en el proceso de tratamiento de muestra previo a la realización de un estudio analítico. Sin embargo, esta técnica también presenta algunas propiedades desfavorables como son el elevado consumo de disolventes, la posibilidad de formación de emulsiones, elevadas interferencias, así como la falta de automatización. En la actualidad, como consecuencia del surgimiento de técnicas más efectivas y con mejores características analíticas, se ha destinado el uso de esta técnica como una primera etapa de extracción o

limpieza previa a otros métodos usados en el proceso de tratamiento de muestra.

5.1.2. Extracción en Fase Sólida (SPE)

La Extracción en Fase Sólida (SPE) es una técnica generalmente utilizada en muestras sólidas como una etapa de purificación de los extractos obtenidos previamente mediante un proceso de extracción con disolventes, mientras que para el caso de muestras líquidas puede utilizarse directamente como una técnica de extracción. Su fundamento se basa en hacer pasar una muestra líquida a través de una columna, la cual recibe el nombre de cartucho, en cuyo interior contiene un sorbente sólido (Lucci *et al.*, 2012). La separación entre los analitos de interés y el resto de los componentes presentes en la muestra líquida se produce en función de la mayor o menor afinidad de cada uno de ellos por el sorbente o por el disolvente, siendo el objetivo que los analitos de interés queden retenidos en el cartucho mientras que el resto de componentes no. El siguiente paso consiste en hacer pasar un disolvente a través del cartucho con objeto de eluir los solutos que han quedado retenidos en él. De esta manera se consigue la preconcentración de los analitos así como la eliminación de interferencias (Andrade-Eiroa *et al.*, 2016). Las etapas en las cuales se puede dividir esta técnica (representadas en la Figura 6) son: 1) acondicionamiento del cartucho mediante el uso de un disolvente con características semejantes a las de la muestra que se va a cargar, 2) adición de la muestra al cartucho, 3) lavado con un disolvente que consiga eluir a los interferentes pero por el que los analitos no presenten ninguna afinidad, y 4) elución de los analitos con un disolvente por el que presenten afinidad.

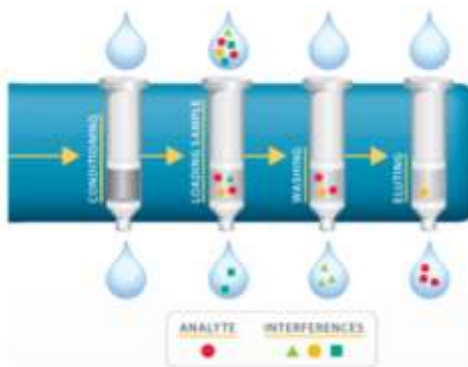


Figura 6. Procedimiento general de una SPE (Andrade-Eiroa *et al.*, 2016)

La SPE puede dividirse, en función de la naturaleza del sorbente utilizado, en diferentes tipos, tales como extracción en fase inversa, extracción en fase normal, de intercambio iónico, extracción mediante cartuchos poliméricos; entre otras. Uno de los tipos más utilizados para el análisis de productos veterinarios y pesticidas son los cartuchos conocidos como Oasis HLB, los cuales contienen un sorbente polimérico de fase reversa, con una gran capacidad de extracción de compuestos polares (Hernández *et al.*, 2006). Otro de los sorbentes más utilizados es el conocido como C₁₈, el cual presenta una naturaleza hidrófoba siendo ampliamente empleado en la extracción de analitos de esta naturaleza (Yamaguchi *et al.*, 2015). Hay estudios que comparan la eficacia de estos sorbentes en la purificación de extractos para el análisis de productos veterinarios en huevos (Frenich *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos en esta comparación muestran un comportamiento similar de ambos tipos de sorbentes para la mayoría de los analitos, obteniéndose un porcentaje de recuperación ligeramente mayor cuando se usa el cartucho OASIS HLB. La única excepción se observa para el caso del sarafloxacin, obteniéndose en este caso un mayor porcentaje con el uso del C₁₈.

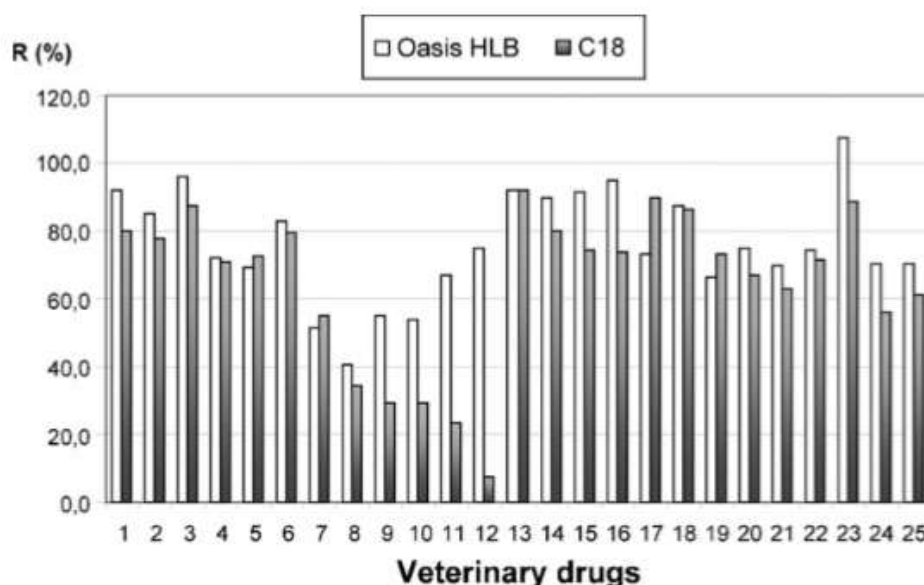


Figura 7. Comparación del efecto del cartucho OASIS HLB y C18 en la purificación de extractos de productos veterinarios.(1) levamisole; (2) thiabendazole; (3) oxfendazole; (4) mebendazole; (5) albendazole; (6) mebendazole; (7) emamectin; (8) ivermectin; (9) tetracycline; (10) oxytetracycline; (11) chlorotetracycline; (12) doxycycline; (13) marbofloxacin; (14) enrofloxacin; (15) danofloxacin; (16) difloxacin; (17) sarafloxacin; (18) sulfadimidine; (19) sulfachlorpyridazine; (20) sulfadimethoxine; (21) sufaquinoxaline; (22) tilmicosin; (23) tylosin; (24) erythromycin; (25) josamycin. (Frenich *et al.*, 2009).

Un factor importante a tener en cuenta en esta técnica es el disolvente elegido para llevar a cabo la elución de los analitos, evitando las pérdidas y consiguiendo los mejores porcentajes de recuperación posibles. Determinados estudios basados en el análisis de productos veterinarios en carne de pollo y huevo (Peters *et al.*, 2009), ponen de manifiesto la importancia de una selección adecuada del disolvente de elución ya que, en función del tipo de matriz, las características analíticas que debe tener el disolvente serán unas otras diferentes. En este estudio en concreto, una mezcla de metanol/acetonitrilo es utilizada para llevar a cabo la elución de los analitos de la columna SPE en el caso de las muestras de carne, sin embargo, para el caso del huevo, el uso de esta mezcla de disolventes resulta en una baja recuperación para algunos de los analitos. Estos porcentajes de recuperación se consiguen mejorar con el empleo de una mezcla de metanol/acetato de etilo, si bien el uso de esta combinación de disolventes tiene como resultado una peor eficiencia en el proceso de purificación. El uso de disolventes con mayor poder de elución para el caso del huevo es necesario como consecuencia de las interacciones de los analitos con las proteínas de la matriz. Esto es debido a una precipitación más eficiente por el acetonitrilo de las proteínas de la carne que del huevo, lo cual hace que la columna SPE quede cargada con un mayor número de interferentes para el caso del huevo.

La extracción en fase sólida es una técnica que ofrece buenos resultados, lo cual se justifica por su frecuente utilización siendo aplicable, además, a una gran variedad de matrices entre las que se incluyen tanto productos alimentarios como leche (Stolker *et al.*, 2008), vino (Campone *et al.*, 2018), pescado (Peters *et al.*, 2009); así como para el análisis de muestras medioambientales (Miossec *et al.*, 2019). Además, esta técnica también presenta un amplio rango de aplicación en cuanto a tipos de analitos se refiere, siendo frecuentemente utilizada para el análisis multiresiduo (Yamaguchi *et al.*, 2015).

5.1.3. Extracción QuEChERS.

Otra técnica de extracción, que está siendo ampliamente utilizada y que ha experimentado un gran desarrollo en los últimos años, es la conocida como extracción QuEChERS (acrónimo en inglés de “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe”). Este método fue inicialmente desarrollado para la extracción de pesticidas en muestras de fruta y vegetales (Anastassiades *et al.*, 2003), y consta, en la mayoría de los casos, de una etapa de extracción con disolventes seguida de una etapa de purificación o *clean-up* mediante una técnica conocida como extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE). En esta etapa de limpieza, una alícuota del extracto obtenido después del proceso de centrifugación se pone en contacto con pequeñas cantidades de sorbente, sobre cuya superficie van a quedar adsorbidas las interferencias presentes en el extracto tras una puesta en contacto de ambos materiales mediante un proceso de agitación. Esta etapa utiliza pequeñas cantidades de sorbente puesto que solo una alícuota del extracto obtenido se somete al procedimiento de limpieza, lo cual hace que sea una metodología menos costosa en comparación con otras técnicas de extracción, como la SPE (Lucci *et al.*, 2012).

Numerosos factores son los que hay que tener en cuenta en este método ya que de ellos van a depender la selectividad, eficacia, sencillez y rapidez del proceso. Algunos de esos factores son el tamaño de muestra, el disolvente empleado, la proporción existente entre la muestra y el disolvente, el tiempo y el modo de agitación, la temperatura, la adición de sales y los sorbentes utilizados en la etapa de purificación.

Además del método QuEChERS publicado inicialmente en el año 2003 (Anastassiades *et al.*, 2003), otras versiones han sido aceptadas posteriormente por organismos oficiales. Las modificaciones que presentan estos métodos respecto al original se basan en el uso de diferentes tampones con objeto de mejorar la eficacia en la extracción de analitos sensibles al pH. Una de estas versiones es la basada en el uso de un tampón acetato, reconocida como un método oficial por parte de la AOAC (Association of Official Analytical Collaboration). Otra modificación de este método es la

basada en el uso de un tampón citrato la cual fue recogida por el CEN (Comité Europeo de Normalización) (Standard Method EN 15662) como otro método oficial derivado de la metodología QuEChERS. Una comparación de estos métodos se muestra en la Figura 8.

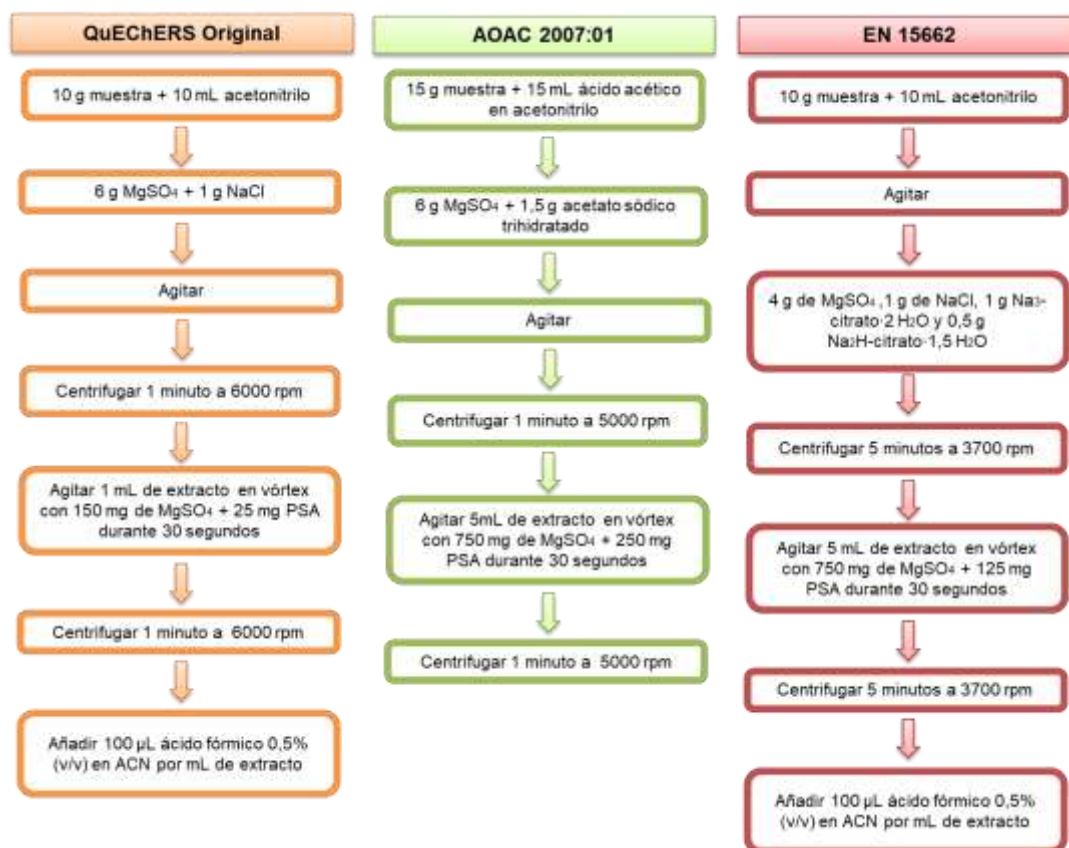


Figura 8. Etapas de los métodos QuEChERS original, AOAC 2007:01 y EN 15662.

Adaptada de (Ferrer-Amate., 2017)

En lo que respecta a la selección del disolvente, los más comúnmente utilizados son el acetonitrilo, la acetona o el acetato de etilo. En el caso concreto de esta técnica, el acetonitrilo es el disolvente más empleado ya que ofrece mejores resultados de extracción en comparación con la acetona y el acetato de etilo, utilizándose en una proporción disolvente/muestra de 1:1, la cual ha demostrado ser apropiada para conseguir una adecuada extracción cuantitativa (González-Curbelo *et al.*, 2015). Son varios los artículos de revisión basados en el método QuEChERS (Perestrelo *et al.*, 2019; Socas-Rodríguez *et al.*, 2017) en los que se recogen múltiples análisis de diferentes tipos de analitos en matrices muy variadas, observándose como el acetonitrilo es el más frecuentemente utilizado y el que ofrece mejores resultados.

El pH del medio extractante también representa un aspecto importante a tener en cuenta en el proceso de extracción. Son numerosos los estudios que demuestran que el empleo de acetonitrilo acidificado permite obtener mejores porcentajes de recuperación tanto para el caso de pesticidas, pues la estabilidad y recuperación de estos se va a ver afectada en función del pH de la matriz (Lehotay *et al.*, 2010), como para el caso de determinados productos veterinarios (Zhang *et al.*, 2015). En un estudio realizado para el análisis de productos veterinarios en miel (Wang *et al.*, 2018), se hace una evaluación del pH de una disolución de acetonitrilo en un rango comprendido entre 3-8, obteniéndose mejores resultados para un valor de pH igual a 4. Para ello se analizan varias soluciones presentando un grado de acidez creciente (desde 0% hasta 5% de ácido acético en acetonitrilo), obteniéndose mejores resultados con el uso de 5% de ácido acético, sobre todo para el caso de quinolonas y de tetraciclinas (Figura 9).

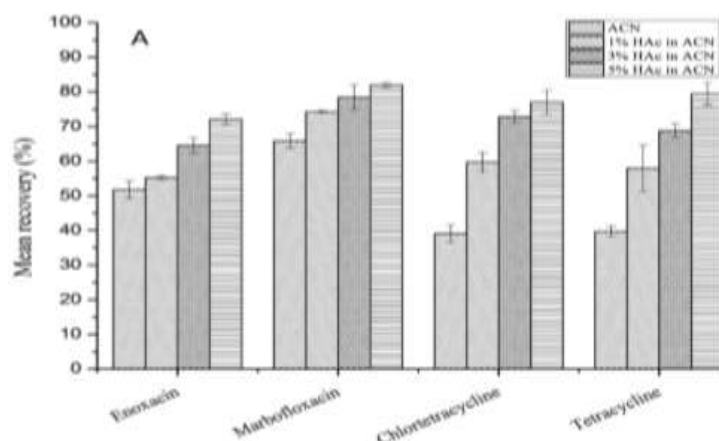


Figura 9. Influencia del pH en la eficacia de recuperación (Wang *et al.*, 2018)

Junto con el ajuste del pH, también suele ser frecuente la adición de agentes quelantes con objeto de incrementar el porcentaje de recuperación de determinados analitos, tales como las tetraciclinas y macrólidos, ya que tienen tendencia a captar iones divalentes del medio (Mg^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2}), formando complejos de coordinación. Para ello, el agente quelante que más comúnmente se utiliza es el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el cual va a evitar la formación de complejos por parte de los analitos debido a la mayor tendencia de este ligando para complejarse con los metales divalentes (Alcántara-Durán *et al.*, 2018).

Tras la puesta en contacto de la muestra con el disolvente o la mezcla de disolventes de extracción, se procede a la adición de sales produciéndose el conocido como “salting-out”, gracias al cual se favorece la transferencia de los analitos hacia la fase orgánica. Son numerosas las sales que pueden utilizarse para esta finalidad como MgCl_2 , NaNO_3 , NaCl , LiCl , así como las sales anhidras de MgSO_4 y Na_2SO_4 . Entre estas sales, el MgSO_4 es una de las que ofrece mejores resultados de separación ya que, al reducir el volumen de la fase acuosa facilita la distribución de los analitos polares en la fase orgánica, permitiendo una alta recuperación de los mismos. Otra de las sales más utilizadas es el NaCl , el cual tiene como función aumentar la fuerza iónica del medio provocando la precipitación de las proteínas de la matriz (Wilkowska *et al.*, 2010). Además de estas dos sales comentadas, también se han realizado estudios que se centran en la eficacia del uso y de la combinación de otras sales (Zhou *et al.*, 2018), observándose una mayor eficacia de extracción para las combinaciones de acetato sódico o NaCl con Na_2SO_4 (recuperación mayor del 60%) que para el MgSO_4 , lo cual podría estar relacionado con la reacción complejante entre productos veterinarios e iones metálicos divalentes (Mg^{+2}), tal y como se ha comentado anteriormente.

La última fase del método QuEChERS consiste en llevar a cabo la etapa de purificación mediante la técnica conocida como extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE), anteriormente comentada. En relación con los sorbentes, el PSA (amina primaria secundaria) es el más frecuentemente empleado, siendo el que se utiliza en el método original. Sin embargo, en función del tipo de matriz, otros tipos de sorbentes pueden utilizarse solos o en combinación con el PSA, como por ejemplo el C_{18} , OASIS HLB y sorbentes de carbono negro grafitizado (GCB). El PSA permite eliminar de manera efectiva ácidos orgánicos, pigmentos o determinadas impurezas de carbohidratos, siendo esta actuación más efectiva con el uso del GCB. Por su parte, el sorbente de C_{18} permite además la eliminación del contenido graso de la matriz (Zhang *et al.*, 2019). En los últimos años está siendo frecuente el uso de un nuevo sorbente conocido como EMR-Lipid (Enhanced Matrix Removal-Lipid), el cual presenta una gran eficacia en la eliminación de lípidos de matrices con un elevado contenido graso, como puede ser el huevo. Determinados estudios (Luo *et al.*,

2019) han realizado una comparación entre los sorbentes de C₁₈ y EMR-Lipid, evaluando la efectividad de los mismos en la eliminación del contenido graso de la matriz, obteniéndose mejores resultados con el uso del sorbente EMR-Lipid. En la Figura 10 se hace una comparación del cromatograma TIC (Total Ion Current) para la purificación con EMR-Lipid y con C₁₈, pudiéndose observar cómo con el uso del EMR-Lipid se obtiene un pico de menor área que con el C₁₈, lo cual indica una mejor purificación para el caso del EMR-Lipid.

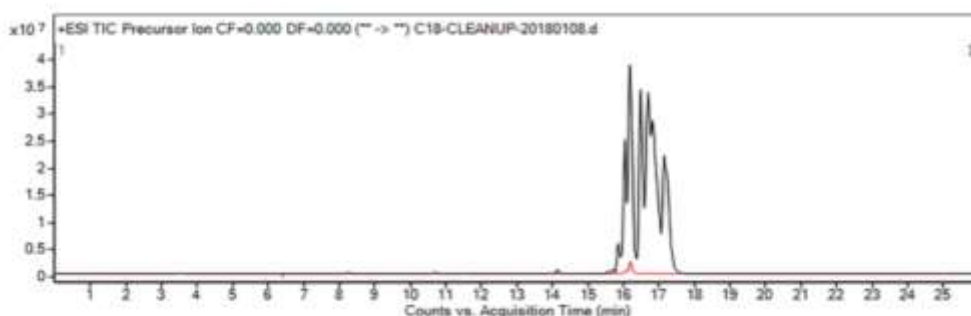


Figura 10. Comparación de los cromatogramas TIC para el uso de EMR-Lipid (rojo) y C₁₈ (negro) (Luo *et al.*, 2019)

Por tanto, se puede concluir que el método QuEChERS constituye una de las técnicas de tratamiento de muestra más importantes en la actualidad debido a sus numerosas ventajas, entre las que se encuentran su sencillez, rapidez, bajo coste económico, bajo consumo de disolventes, compatible con los análisis mediante GC/MS y LC/MS, así como la posibilidad de permitir un análisis multiresiduo. Numerosos estudios comparan la eficacia de este método con otras técnicas de extracción como la SPE (García y Gotah., 2017; Villar-Pulido *et al.*, 2011), obteniéndose mejores resultados en términos de porcentajes de recuperación y efecto matriz con el uso del método QuEChERS.

5.2. Cromatografía de líquidos acoplada con espectrometría de masas

Según las recomendaciones establecidas por la Directiva 2002/657/EC y la guía SANTE/12682/2019, el uso de una técnica cromatografía combinada con la espectrometría de masas como sistema de detección, constituye el método más adecuado para la determinación de contaminantes orgánicos en alimentos. Es por ello, que los sistemas más frecuentemente utilizados se

basan en el empleo de técnicas híbridas como son la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). En este sentido, la LC-MS supone una técnica especialmente adecuada para el análisis de contaminantes en alimentos, ya que facilita la obtención de gran cantidad de información sobre el análisis de muestras complejas, permitiendo la identificación y cuantificación de múltiples analitos, siendo todo esto posible en un solo análisis (Malik *et al.*, 2010). En el contexto de la Seguridad Alimentaria, el uso de una técnica con estas características es fundamental puesto que se requiere de un análisis a nivel de trazas.

La cromatografía de líquidos (LC) es una técnica analítica que va a permitir la separación de una mezcla de solutos en función de la velocidad de desplazamiento diferencial de cada uno de ellos al ser arrastrados por una fase móvil (líquida) a través de un lecho cromatográfico, el cual contiene la fase estacionaria (sólida o líquida). En función del tipo de fase estacionaria es posible distinguir distintos tipos de LC como son la cromatografía de adsorción, de reparto, de intercambio iónico y de exclusión molecular. La instrumentación básica de un cromatógrafo de líquidos queda recogida en la Figura 11.

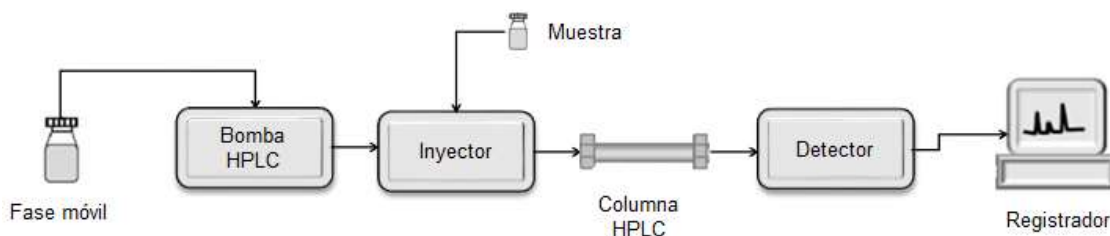


Figura 11. Instrumentación básica de un cromatógrafo de líquidos

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta durante el análisis cromatográfico es el tipo de columna en la que se va a realizar la separación. Una de las más conocidas es la columna de C_{18} , la cual es una de las fases estacionarias de fase reversa más frecuentemente utilizadas, proporcionando buenos resultados en la separación de pesticidas y productos veterinarios (Piatkowska *et al.*, 2015; Moretti *et al.*, 2015). El tamaño de partícula del relleno de la columna va a permitir diferenciar dos variantes de cromatografía de líquidos como son la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y la

Cromatografía Líquida de Ultra-Elevada Eficacia (UHPLC). Ambas utilizan típicamente columnas con un diámetro comprendido entre 3,0-4,6 mm (Agilent Technologies., 2016). Sin embargo, como se ha comentado, la diferencia entre ambas técnicas radica en el tamaño de partícula de la fase estacionaria, ya que en HPLC suele utilizarse un tamaño comprendido entre 2-5 μm mientras que en UHPLC este tamaño es menor de 2 μm , justificando de esta manera la mayor eficacia de UHPLC frente a HPLC. Otros factores que contribuyen a aumentar la eficacia de separación son la reducción de la longitud y el diámetro de columna (Guillarme y Veuthey, 2017; Fekete *et al.*, 2014).

Otro parámetro que va a jugar un papel importante en la cromatografía es la fase móvil utilizada para llevar a cabo la elución de los analitos retenidos. La selección de esta fase móvil dependerá de la naturaleza de los compuestos a analizar, siendo los disolventes más frecuentemente utilizados el metanol y el acetonitrilo (Zhu *et al.*, 2015; Moretti *et al.*, 2015). La adición de ciertos ácidos a la fase móvil, tales como el ácido fórmico, puede inducir la formación de iones protonados mejorando así la sensibilidad de detección. Esto ocurre especialmente en determinados medicamentos que apenas podrían ionizarse en condiciones neutras o alcalinas (Zhou *et al.*, 2018). Es por ello que normalmente se suele utilizar como fase móvil algunos de estos dos disolventes a los que se le añaden pequeños porcentajes de ácidos.

La otra técnica de la que se va a hacer uso junto con la LC es la espectrometría de masas, la cual permite medir la relación masa/carga (m/z) de una serie de iones en fase gaseosa. El modo de operación de un espectrómetro de masas sigue los siguientes pasos: 1) ionización de la muestra y creación de iones en fase gas, 2) separación de los iones en función de la relación m/z , 3) medida de la cantidad de iones para cada valor m/z . En la Figura 12 se muestra un esquema de un espectrómetro de masas.

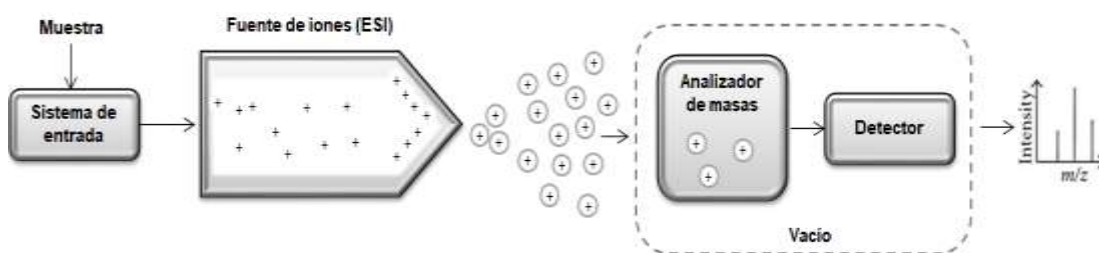


Figura 12. Esquema de funcionamiento de un espectrómetro de masas

El acoplamiento entre el cromatógrafo y el espectrómetro de masas se realiza a través de una fuente de ionización, siendo necesaria para producir la transformación de los analitos desde el estado líquido hasta el estado gaseoso. El principal modo de ionización utilizado en el análisis de pesticidas por LC/MS se basa en la ionización a presión atmosférica (API), que incluye la ionización por electrospray (ESI), la ionización química a presión atmosférica (APCI) y la fotoionización a presión atmosférica (APPI). Dentro de estas tres fuentes de ionización la más frecuentemente utilizada es la ionización por electrospray (Holčapek *et al.*, 2012), la cual está basada en la aplicación de una diferencia de potencial entre el terminal de un capilar (contiene la fase móvil) y la entrada del espectrómetro de masas. Un esquema simplificado de esta fuente de iones puede observarse en la Figura 12. Cuando la carga acumulada en el extremo del capilar supera la tensión superficial se forma una gota o ésta se rompe en otras más pequeñas mediante un proceso conocido como “explosión Coulómbica”. La repetición sucesiva de este proceso permite la transformación de los iones a fase gaseosa. La entrada de los iones en fase gaseosa al espectrómetro de masas se produce debido a la fuerza de atracción entre las partículas con una determinada carga y el electrodo de carga opuesta, además de la diferencia de presión entre el vacío del interior y la presión atmosférica (Covey *et al.*, 2009).

Uno de los elementos más importantes del espectrómetro de masas es el analizador, el cual va a permitir clasificar los diferentes iones generados en función de su relación m/z . Los analizadores se pueden clasificar de manera general en cuatro grupos: analizadores de sectores eléctricos o magnéticos, de tiempo de vuelo (TOF), de cuadrupolo (Q) y de confinamiento de iones (Orbitrap, Trampa de iones (IT)). Estos analizadores también se van a clasificar en función de su resolución (R), definiéndose esta propiedad como la habilidad para diferenciar entre componentes de masa parecida. De esta manera, se habla de espectrometría de masas de baja resolución cuando $R < 5000$ y de alta resolución cuando $R > 5000$. Dentro de los analizadores de baja resolución es posible encontrar el analizador cuadrupolar y el de trampa de iones, mientras que el analizador de tiempo de vuelo y el orbitrap constituirían analizadores de alta resolución. Los analizadores de baja resolución solo van a poder informar

acerca de la masa nominal, mientras que los de alta resolución permiten obtener medidas de masas más exactas con cuatro o más cifras decimales. Una ventaja importante a tener en cuenta de los espectrómetros de masas de alta resolución (HRMS) es la posibilidad del análisis retrospectivo, lo cual permitiría descubrir compuestos inesperados o no permitidos en las muestras. Esto es posible ya que con HRMS se puede trabajar en modo “full scan”, permitiendo de esta manera registrar todas las masas presentes en una muestra que hayan sido ionizadas (Núñez *et al.*, 2012). Una vez obtenido un valor de masa exacta es posible conocer la composición elemental de un compuesto haciendo uso de su perfil isotópico, independientemente de que el método estuviese preparado inicialmente para su detección, o no. Por ejemplo, gracias al empleo de HRMS se han identificado metabolitos de pesticidas que posteriormente se han podido identificar con otras técnicas y con el uso de estándares (Thurman *et al.*, 2005).

Existe otro tipo de espectrometría de masas conocida como espectrometría de masas en tándem o MS/MS. En este caso no solo se lleva a cabo la ionización de los analitos, sino que también se produce la fragmentación y, a partir de iones precursores, formar iones producto. Cuando se trabaja en modo MS/MS hay que tener en cuenta que habitualmente no es posible realizar un análisis retrospectivo de las muestras, ya que para conseguir la máxima especificidad y sensibilidad en el análisis de residuos, se suelen predefinir los valores m/z de los compuestos a analizar y, por tanto, no se registrarán aquellos que no se hayan definido con anterioridad (Thurman *et al.*, 2005). Existen varios tipos de analizadores que permiten trabajar en modo MS/MS como por ejemplo el de trampa de iones, trampa de iones lineal (LIT), el analizador de resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier (FT-ICR), el de triple cuadrupolo (QQQ), así como analizadores híbridos como Q-TOF, LIT-FTICR, entre otros. Una recopilación de los diferentes tipos de analizadores puede observarse en la Tabla 10.

Tabla 10. Descripción de diferentes tipos de analizadores (SANTE/12682/2019)

Resolución	Analizador	Modo de trabajo	Nº mínimo de iones para la detección
Medida de masa unitaria	MS Simple Q, IT, TOF	Full Scan, SIM, rango <i>m/z</i> limitado	3 iones
	MS/MS QQQ, Q-IT, Q-TOF, Q-Orbitrap	Monitoreo de reacción múltiple o seleccionado (SRM, MRM)	2 iones producto
Medida de masa precisa	HRMS Q-TOF Q-Orbitrap FT-ICR-MS Sector magnético	Full Scan, SIM, rango <i>m/z</i> limitado Fragmentación con o sin selección de iones precursores o su combinación	2 iones con masa precisa ≤ 5 ppm

Para la interpretación de los resultados, la Decisión de la Comisión 2002/657/EC establece un sistema de identificación de puntos, siendo necesario un mínimo de puntos en función de la sustancia en cuestión. Este número suele oscilar entre 3 y 4 puntos de identificación. En la Tabla 11 se presenta el número de puntos de identificación que pueden obtenerse con cada una de las técnicas de espectrometría de masas.

Tabla 11. Relación entre diversos tipos de fracciones de masa y puntos de identificación obtenidos (2002/657/EC)

Técnica de MS	Puntos de identificación obtenidos por ion
Espectrometría de masas de baja resolución (LR)	1,0
Ion-precursor LR-MSⁿ	1,0
Productos de transición LR-MSⁿ	1,5
Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)	2,0
Ion-precursor HR-MSⁿ	2,0
Productos de transición HR-MSⁿ	2,5

Un aspecto importante a tener en cuenta es el tipo de ionización utilizada en el análisis, pudiendo ser ionización en modo positivo $[M+H]^+$ o en modo negativo $[M-H]^-$. Cabe destacar que la mayoría de los fármacos y pesticidas se miden utilizando un modo de ionización positivo aunque también existen compuestos que se miden en modo negativo, pudiendo observar algunos ejemplos dentro

de los analitos presentes en la Tabla 6, como es el caso del diclazuril, tiamfenicol o el fipronil.

La espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) tiene una gran aplicación en el campo de análisis de residuos, especialmente mediante el uso del analizador de tiempo de vuelo debido a su buena aplicabilidad y bajo coste. Sin embargo, varios estudios han comparado la eficacia de este analizador con el orbitrap para el análisis de pesticidas y fármacos en matrices alimentarias, obteniéndose mejores resultados en términos de recuperación y sensibilidad para el caso del orbitrap, si bien este último tiene el inconveniente de su elevado coste (Gómez-Pérez *et al.*, 2015).

Otros de los analizadores empleados son los de tipo cuadrupolar, los cuales se suelen utilizar en combinación con otros analizadores ya que son poco sensibles para el análisis de residuos. Son numerosos los estudios que hacen uso del analizador híbrido Q-TOF para el análisis de pesticidas, fármacos, así como otros contaminantes orgánicos en alimentos, permitiendo obtener espectros MS/MS con fragmentos de una gran exactitud de masas (Pérez-Ortega *et al.*, 2016; Hou *et al.*, 2020; Weng *et al.*, 2019).

Dentro de los analizadores cuadrupolares cabe destacar el analizador de triple cuadrupolo (QQQ), el cual es uno de los más utilizados para análisis de residuos en modo MS/MS debido a su alta sensibilidad (Núñez *et al.*, 2012), siendo una alternativa muy habitual al uso de HRMS. Es posible encontrar en bibliografía abundantes referencias que comparan la eficiencia de este analizador con otras alternativas. Un estudio basado en el análisis de fármacos en carne e hígado de ave realiza una comparación entre un analizador de triple cuadrupolo y uno de tiempo de vuelo (Rocha *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas, siendo ambos métodos igualmente válidos para el análisis. Otro estudio también compara la eficacia del triple cuadrupolo respecto a un analizador de trampa de iones cuadrupolar, demostrándose la mayor superioridad del QQQ respecto a la IT (Soler *et al.*, 2005).

6. PROPUESTA DE UN MÉTODO Y JUSTIFICACIÓN

Una vez realizada la revisión bibliográfica acerca de los distintos tratamientos de muestra y métodos de análisis disponibles, se va a proceder a realizar una propuesta de un método para llevar a cabo la determinación de residuos de pesticidas y productos veterinarios en muestras de huevo y carne de pollo.

Para llevar a cabo la etapa de tratamiento de muestra se propone un método QuEChERS (García y Gotah., 2017), haciendo uso de un tampón citrato y en el que se incorpora la adición de EDTA entre las sales para la recuperación de tetraciclinas (Alcántara-Durán *et al.*, 2018). Para conseguir una precipitación completa de las proteínas de la muestra se hace uso del acetonitrilo, el cual se utiliza en combinación con un ácido permitiendo así una detección más eficaz de los analitos que se analizan en modo positivo. Esta extracción va seguida de una fase de purificación basada en una d-SPE empleando EMR-Lipid como sorbente (Luo *et al.*, 2019). Para llevar a cabo la etapa de detección y cuantificación se propone el uso de la combinación LC-TOFMS, debido a su capacidad para proporcionar masas exactas y a su menor coste en comparación con un orbitrap (Gómez-Pérez *et al.*, 2015). Tal y como se comentaba anteriormente, la necesidad de actualizar los métodos analíticos para la determinación de compuestos desconocidos o insospechados es otra razón por la que se propone esta combinación, gracias a la posibilidad del TOF de trabajar en modo “full scan” (Thurman *et al.*, 2005). También se podría recurrir al uso de técnicas híbridas QQQ, Q-TOF o Q-IT en el caso de que los resultados obtenidos no alcancen la sensibilidad adecuada o no se consiga determinar de manera irrefutable la presencia de un determinado metabolito.

7. CONCLUSIONES

En este Trabajo de Fin de Grado se ha realizado una revisión bibliográfica acerca del análisis de pesticidas y productos veterinarios en huevo y carne de pollo. Las principales conclusiones obtenidas son las siguientes:

- Se ha demostrado que el método QuEChERS es el más adecuado para llevar a cabo la etapa de tratamiento de muestra de acuerdo con las características de las muestras y analitos propuestos para el análisis.
- Se ha demostrado que la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas es la técnica más adecuada para la detección de los analitos estudiados, poniendo de manifiesto la importancia de la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) con objeto de conseguir una identificación y cuantificación inequívoca de los analitos.
- Se ha realizado la propuesta de un método análisis basado en la utilización del método QuEChERS incluyendo el uso de sales de citrato y EDTA, y determinación mediante LC/MS haciendo uso de un analizador de tiempo de vuelo (LC-TOFMS).

8. BIBLIOGRAFÍA

- 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>
- 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.

- Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancellieri, V., & Cerdà, V. (2016). *Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80, 641–654.
- Berendsen, B. J. A., Stolker, L. A. A. M., Nielen, M. W. F., & Nielen, M. W. F. (2013). *Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS. TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 43, 229–239.
- Campone, L., Piccinelli, A. L., Celano, R., Pagano, I., Russo, M., & Rastrelli, L. (2018). *Rapid and automated on-line solid phase extraction HPLC–MS/MS with peak focusing for the determination of ochratoxin A in wine samples. Food Chemistry*, 244, 128–135.
- 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, Y., Guo, Z., Wang, X., & Qui, C. (2008). *Sample preparation. Journal of Chromatography A*, 1184, 191–219.
- ChiaoChan, 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.
- Codex Alimentarius FAO-WHO. Base de datos en línea del Codex. Disponible en web: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/es/>
- Covey, T. R., Thomson, B. A., & Schneider, B. B. (2009). *Atmospheric pressure ion sources. Mass Spectrometry Reviews*, 28, 870–897.
- Dasenaki, M. E., & Thomaidis, N. S. (2015). *Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta*, 880, 103–121.

- 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.
- EU Pesticides database. Disponible en web: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>
- Fekete, S., Schappler, J., Veuthey, J.-L., & Guillarme, D. (2014). *Current and future trends in UHPLC. TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 63, 2–13.
- Ferrer-Amate, C. (2017). Tesis doctoral: *Nuevos desarrollos en el análisis y control de calidad de residuos de plaguicidas en frutas y verduras*.
- 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.
- Garcia, C. V., & Gotah, A. (2017). *Application of QuEChERS for Determining Xenobiotics in Foods of Animal Origin. Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2017, 1–13.
- Gómez-Pérez, M. L., Romero-González, R., Vidal, J. L. M., & Frenich, A. G. (2015). *Identification of transformation products of pesticides and veterinary drugs in food and related matrices: Use of retrospective analysis. Journal of Chromatography A*, 1389, 133–138.
- 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.
- Guillarme, D., & Veuthey, J.-L. (2017). *Theory and Practice of UHPLC and UHPLC–MS. Handbook of Advanced Chromatography/mass Spectrometry Techniques*, 1–38.
- Hamamoto, K., Iwatsuki, K., Akama, R., & Koike, R. (2017). *Rapid multi-residue determination of pesticides in livestock muscle and liver tissue via modified*

QuEChERS sample preparation and LC/MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34, 1162-1171.

- Hernández, F., Pozo, O. J., Sancho, J. V., Bijlsma, L., Barreda, M., & Pitarch, E. (2006). *Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities. Journal of Chromatography A*, 1109, 242–252.
- Hildmann, F., Gottert, C., Frenzel, T., Kempe, G., & Speer, K. (2015). *Pesticide residues in chicken eggs. A sample preparation methodology for analysis by gas and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A*, 1403, 1–20.
- Holčápek, M., Jirásko, R., & Lísa, M. (2012). *Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques. Journal of Chromatography A*, 1259, 3–15.
- Hou, X., Xu, X., Xu, X., Han, M., & Qiu, S. (2020). *Application of a Multiclass Screening Method for Veterinary Drugs and Pesticides Using HPLC-QTOF-MS in Egg Samples. Food Chemistry*, 309, 125746.
- Instituto de Estudios del Huevo. Disponible en web: <https://www.institutohuevo.com/>
- Jammoul, & El Darra. (2019). *Evaluation of Antibiotics Residues in Chicken Meat Samples in Lebanon. Antibiotics*, 8, 69.
- Jiménez, V., Rubies, A., Centrich, F., Companyó, R., & Guiteras, J. (2011). *Development and validation of a multiclass method for the analysis of antibiotic residues in eggs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A*, 1218, 1443–1451.
- 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.
- Lucci, P., Pacetti, D., Nunez, O., & Frega, N. G. (2012). *Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis. Chromatography. Chapter 5*, 127-164.

- 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.*
- Malik, A. K., Blasco, C., & Picó, Y. (2010). *Liquid chromatography–mass spectrometry in food safety. Journal of Chromatography A, 1217, 4018–4040.*
- *Maximum Residue Limits (MRL) Database, USDA Foreign Agricultural Service.* Disponible en web: <https://www.fas.usda.gov/maximum-residue-limits-mrl>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Disponible en web: <https://www.mapa.gob.es/es/>
- Miossec, C., Lanceleur, L., & Monperrus, M. (2019). *Multi-residue analysis of 44 pharmaceutical compounds in environmental water samples by solid phase extraction coupled to liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Separation Science, 42, 1853-1866.*
- Mol, H. G. J., Plaza-Bolaños, P., Zomer, P., de Rijk, T. C., Stolker, A. A. M., & Mulder, P. P. J. (2008). *Toward a Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins, and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes. Analytical Chemistry, 80, 9450–9459.*
- Moretti, S., Dusi, G., Giusepponi, D., Pellicciotti, S., Rossi, R., Saluti, G., Cruciani, G., & Galarini, R. (2015). *Screening and confirmatory method for multiclass determination of 62 antibiotics in meat. Journal of Chromatography A, 1429, 175–188.*
- Nakajima, T., Nagano, C., Sasamoto, T., Hayashil, H., Kanda, M., Kanai, S., Takeba, K., Matsushima, Y., & Takano, I. (2012). *Development and Validation of Rapid Analysis Method for Multi-Class Veterinary Drugs in Livestock Products by LC-MS/MS. Food Hygiene and Safety, 53, 243–253.*
- Nováková, L., & Vlčková, H. (2009). *A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. Analytica Chimica Acta, 656, 8-35.*
- Núñez, O., Gallart-Ayala, H., Ferrer, I., Moyano, E., & Galceran, M. T. (2012). *Strategies for the multi-residue analysis of 100 pesticides by liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1249, 164–180.*

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2003). *Código Internacional de conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. Artículo 2º: Términos y definiciones*. Disponible en web: <http://www.fao.org/3/y4544s/y4544s00.htm>
- Organización Interprofesional del Huevo y sus Productos. Disponible en web: <https://www.inprovo.com/>
- Organización Mundial de la Salud y Programa Internacional sobre Seguridad Química. (2010). *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009. World Health Organization*. Disponible en web: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44271>
- 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.*
- Peters, R. J. B., Bolck, Y. J. C., Rutgers, P., Stolker, A. A. M., & Nielen, M. W. F. (2009). *Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1216, 8206–8216.*
- Piatkowska, M., Jedziniak, P., & Zmudzki, J. (2015). *Multiresidue method for the simultaneous determination of veterinary medicinal products, feed additives and illegal dyes in eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Chemistry 197, 571-580.*
- Rahman, M. M., Kim, S. W., Na, T. W., Abd El-Aty, A. M., Lee, Y.J., Park, J.S., Ramadan, A., Lee, H.S., Ghung, H.S., Choi, J.H., Shin, H.C., & Shim, J.H. (2016). *QuEChERS method for the simultaneous quantification of phorate and its metabolites in porcine and chicken muscle and table eggs using ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Journal of Separation Science, 39, 2079–2086.*
- Real Decreto 1749/1998, de 31 de julio, por el que se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos.
- Real Decreto 372/2003, de 28 de marzo, por el que se establece y regula el Registro general de establecimientos de gallinas ponedoras.

- Reglamento (CE) n° 149/2008 de la Comisión, de 29 de enero de 2008, por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo.
- 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.
- Rocha, D. G., Santos, F. A., da Silva, J. C. C., Augusti, R., & Faria, A. F. (2014). *Multiresidue determination of fluoroquinolones in poultry muscle and kidney according to the regulation 2002/657/EC. A systematic comparison of two different approaches: Liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry or tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1379, 83–91*
- Soler, C., Mañes, J., & Picó, Y. (2005). *Comparison of liquid chromatography using triple quadrupole and quadrupole ion trap mass analyzers to determine pesticide residues in oranges. Journal of Chromatography A, 1067, 115–125.*
- Stolker, A. A. M., Rutgers, P., Oosterink, E., Lasaroms, J. J. P., Peters, R. J. B., van Rhijn, J. A., & Nielen, M. W. F. (2008). *Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC–TOF-MS. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391, 2309–2322.*
- Thurman, E. M., Ferrer, I., Zweigenbaum, J. A., García-Reyes, J. F., Woodman, M., & Fernández-Alba, A. R. (2005). *Discovering metabolites of post-harvest fungicides in citrus with liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry*

and ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1082, 71–80.

- Tu, Q., Hickey, M.E., Yang, T., Gao, S., Zhang, Q., Qu, Y., Du, X., Wang, J., & He, L. (2018). *A simple and rapid method for detecting the pesticide fipronil on egg shells and in liquid eggs by Raman microscopy*. *Food Control*, 96, 16-21.
- Valero, T., del Pozo, S., Ruíz, E., Ávila, JM., & Varela, G. (2017). *Guía nutricional de la carne*. Federación Española de la Nutrición. Disponible en web: <https://www.fen.org.es/>
- Villar-Pulido, M., Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., Martos, N. R., & Molina-Díaz, A. (2011). *Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry*. *Talanta*, 85, 1419–1427.
- Wang, Z., Li, Y., Chang, Q., Kang, J., & Pang, G.-F. (2018). *A detection and confirmation strategy for screening of veterinary drugs in honey by liquid chromatography coupled quadrupole time-of-flight mass spectrometry*. *Analytical Methods*, 10, 59–68.
- Ware, G.W. (1983). *Pesticides: Theory and Application*. San Francisco: W.H. Editorial Freeman and Company.
- Weng, R., Lou, S., Pang, X., Song, Y., Su, X., Xiao, Z., & Qiu, J. (2019). *Multi-residue analysis of 126 pesticides in chicken muscle by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry*. *Food Chemistry*, 309, 125503.
- Wilkowska, A., & Biziuk, M. (2010). *Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology*. *Food Chemistry*, 125, 803–812.
- Yamaguchi, T., Okihashi, M., Harada, K., Uchida, K., Konishi, Y., Kajimura, K., Hirata, K., & Yamamoto, Y. (2015). *Rapid and Easy Multiresidue Method for the Analysis of Antibiotics in Meats by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 5133–5140.
- 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). *Multi-class, 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.
- Zhou, J., Xu, J. J., Cong, J. M., Cai, Z. X., Zhang, J. S., Wang, J. L., & Ren, Y. P. (2018). *Optimization for quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction of mycotoxins and veterinary drugs by response surface methodology for application to egg and milk*. *Journal of Chromatography A*, 1532, 20-29.
- Zhu, R., Zhao, Z., Wang, J., Bai, B., Wu, A., Yan, L., & Song, S. (2015). *A simple sample pretreatment method for multi-mycotoxin determination in eggs by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 1417, 1–7.