

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO LC-MS/MS PARA
LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE
PESTICIDAS EN EXTRACTOS VEGETALES**



Trabajo Fin de Grado
Esther García Navarro

Universidad Miguel Hernández de Elche
Facultad de Ciencias Experimentales
Grado en Biotecnología

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Curso Académico 2025-2026

Tutores:

Dra. María Losada Echeberría

Dra. María Dolores Herranz López

Dr. Vicente Micol Molina

RESUMEN

El auge en el desarrollo y uso de extractos vegetales con aplicaciones terapéuticas, cosméticas y nutraceuticas ha incrementado la necesidad de someter estas matrices a un riguroso control de contaminantes químicos. En el proceso de extracción de las materias primas, los residuos de pesticidas se pueden concentrar, llegando en algunos casos a superar los límites máximos de residuos establecidos por la legislación y constituyendo un potencial riesgo toxicológico para el consumidor. Además de sus implicaciones sanitarias y legislativas, la presencia inadvertida de estos contaminantes en la investigación biotecnológica es un desafío crítico, ya que podrían interferir en las respuestas moleculares observadas y dificultar la atribución de la actividad biológica observada exclusivamente a los compuestos presentes en el extracto.

El objetivo de este proyecto fue desarrollar y validar un método analítico multiresiduo de alta sensibilidad mediante cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) para la determinación simultánea de residuos de pesticidas en extractos vegetales complejos. Con este objetivo se seleccionó un panel inicial de 203 pesticidas y el método se aplicó a un extracto de granada con potencial cosmético y a un extracto bioactivo de paja de arroz.

Para ello, se desarrolló una base de datos con las transiciones MRM y los tiempos de retención de los analitos, se optimizaron las condiciones cromatográficas y espectrométricas y se validó el método para 168 pesticidas. Posteriormente, se aplicó al análisis de dos extractos vegetales con el fin de evaluar la presencia de residuos y determinar su calidad química.

El método desarrollado constituye una herramienta sensible y selectiva para el control de residuos de pesticidas en extractos vegetales complejos, contribuyendo al control de su calidad química y proporcionando una herramienta analítica fiable para la correcta interpretación de futuros estudios biológicos.

PALABRAS CLAVE: Residuos de pesticidas, extractos vegetales, UHPLC-MS/MS, validación analítica, análisis multiresiduo.

ABSTRACT

The increasing development and use of plant extracts with therapeutic, cosmetic and nutraceutical applications have increased the need to subject these matrices to rigorous monitoring of chemical contaminants. During the extraction of raw plant materials, there is a possibility that pesticide residues may become concentrated, in some cases exceeding the maximum residue limits that have been established by legislation. This could constitute a potential toxicological risk to consumers. In addition to their health and regulatory implications, the unintended presence of these contaminants in biotechnological research represents a critical challenge, as they may interfere with the observed molecular responses and hinder the attribution of the observed biological activity exclusively to the compounds present in the extract.

The objective of this project was to develop and validate a highly sensitive multiresidue analytical method using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) for the simultaneous determination of pesticide residues in complex plant extracts. For the purpose of this study, an initial panel of 203 pesticides was selected for analysis. The method was then applied to a pomegranate extract with cosmetic potential and a bioactive rice straw extract.

In order to achieve this objective, a database was developed containing the MRM transitions and retention times of the analytes. The chromatographic and mass spectrometric conditions were then optimized, and the method was validated for 168 pesticides. Subsequently, the method was applied to the analysis of two plant extracts to evaluate the presence of pesticide residues and determine their chemical quality.

The developed method constitutes a sensitive and selective tool for the monitoring of pesticide residues in complex plant extracts, thus contributing to the control of their chemical quality and providing a reliable analytical tool for the correct interpretation of future biological studies.

KEY WORDS: Pesticide residues, plant extracts, UHPLC-MS/MS, analytical validation, multiresidue analysis.

ABREVIATURAS

UHPLC-MS/MS: cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem

QqQ: triple cuadrupolo

ESI: ionización por electrospray

CID: disociación inducida por colisión

MRM: monitorización de reacciones múltiples

LMR: Límites Máximos de Residuos

LOD: límite de detección

LOQ: límite de cuantificación

ACN: acetonitrilo

DMSO: dimetilsulfóxido

FST: Factor de Seguridad Toxicológica



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Definición de pesticidas	6
1.2. Clasificación de pesticidas y mecanismos de acción	6
1.3. Efecto de pesticidas en la salud	7
1.4. Legislación y Límites Máximos de Residuos	8
1.4.1. Pesticidas tóxicos que se usan comúnmente	8
1.5. Extractos vegetales	9
1.6. Técnicas analíticas	9
1.6.1. Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución (UHPLC)	10
1.6.2. Ionización por Electrospray (ESI)	11
1.6.3. Espectrometría de Masas en Tándem (MS/MS)	11
1.7. Guía SANTE	12
1.7.1. Efecto matriz	13
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Reactivos y estándares analíticos	15
3.2. Instrumentación y condiciones analíticas	17
3.3. Preparación de las Rectas de Calibración	18
3.4. Extractos	20
3.4.1. Viqua	20
3.4.2. Paja de arroz	21
3.5. Validación del método analítico	21
3.5.1. Parámetros de validación del método	21
3.5.2. Tratamiento automatizado de datos y análisis estadístico	22
3.5.3. Evaluación de la adecuación toxicológica del método para ensayos celulares	23
4. RESULTADOS	25
4.1. Optimización del método UHPLC-MS/MS	25
4.2. Curvas de calibración y linealidad	26
4.3. Límites de detección y cuantificación	27
4.4. Precisión y exactitud del método	28
4.5. Estabilidad de los patrones	29
4.6. Aplicación del método a los extractos vegetales	29
4.7. Evaluación de la adecuación toxicológica del método para ensayos celulares	30
5. DISCUSIÓN	32
6. CONCLUSIÓN	35
7. AGRADECIMIENTOS	36
8. BIBLIOGRAFÍA	37
9. ANEXOS	40

1. INTRODUCCIÓN

El creciente interés por los extractos vegetales como fuente de compuestos bioactivos ha impulsado su uso en la industria farmacéutica, cosmética y nutracéutica, así como en investigación biomédica. En estos ámbitos, garantizar su calidad química es esencial, ya que la presencia de contaminantes puede comprometer tanto su seguridad como la correcta interpretación de los estudios sobre su actividad biológica.

Entre los principales contaminantes se encuentran los residuos de pesticidas. Aunque estas sustancias son fundamentales para la protección de los cultivos y el aumento de la productividad agrícola, pueden permanecer en la materia prima y concentrarse durante el proceso de extracción. Como consecuencia, los extractos pueden contener niveles superiores a los presentes inicialmente en la planta, lo que hace necesario disponer de estrategias analíticas que permitan controlar estos residuos y verificar el cumplimiento de los límites máximos establecidos por la legislación vigente ^[1] ^[2].

La elevada complejidad química de estas matrices y las bajas concentraciones a las que suelen encontrarse estos contaminantes plantean importantes retos analíticos. En este contexto, la cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) se ha consolidado como una de las técnicas más sensibles y selectivas para la determinación simultánea de residuos de pesticidas, proporcionando resultados fiables en matrices complejas y facilitando su aplicación en estudios biológicos.

1.1. Definición de pesticidas

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), los pesticidas son sustancias o mezclas compuestas por ingredientes químicos o biológicos destinadas a repeler, destruir o controlar plagas que afecten a cultivos, así como regular el crecimiento vegetal ^[3].

La diversidad química de estos pesticidas, junto a su capacidad de bioacumulación y persistencia ambiental, favorecen que sus residuos permanezcan en suelos, aguas y cultivos durante largos periodos de tiempo. Esta situación, junto con el uso continuado de tratamientos fitosanitarios, es lo que hace que su control analítico con técnicas de alta selectividad sea imprescindible actualmente ^[2].

1.2. Clasificación de pesticidas y mecanismos de acción

Los pesticidas constituyen un grupo de compuestos químicos de elevada diversidad estructural y funcional. Aunque pueden clasificarse según distintos criterios, la clasificación más

utilizada se basa en su organismo diana, distinguiéndose principalmente insecticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas y otros productos fitosanitarios específicos ^[4].

Independientemente de su clasificación, los pesticidas se diseñan para que interactúen con las dianas moleculares específicas del organismo plaga. Su mecanismo de acción consiste en la interacción con dianas moleculares implicadas en procesos fisiológicos esenciales de los organismos plaga, alterando rutas metabólicas o funciones celulares que provocan su muerte o inhiben su desarrollo ^[5]. Sin embargo, esta especificidad no es absoluta, ya que numerosos organismos no diana comparten vías metabólicas y proteínas homólogas con las especies objetivo. Como consecuencia, algunos pesticidas pueden interaccionar también con receptores, enzimas o canales iónicos de mamíferos y otros organismos, lo que explica parte de su potencial toxicológico ^[6].

1.3. Efecto de pesticidas en la salud

En la actualidad el uso de plantas medicinales y tratamientos naturales es cada vez más popular. Por ello, es importante saber que la presencia de residuos de pesticidas en estas matrices vegetales puede suponer un riesgo a la salud de los consumidores ^[7].

Una exposición crónica a ciertos pesticidas puede asociarse distintos efectos adversos en la salud, impulsados por mecanismos de daño celular como el estrés oxidativo, alteraciones genéticas o disfunción mitocondrial. Las principales patologías son los trastornos neurodegenerativos como Parkinson o Alzheimer, alteraciones endocrinas, efectos carcinógenos y toxicidad reproductiva (Figura 1). Además, también se ha encontrado relación a este riesgo toxicológico con el desarrollo de diabetes y afecciones respiratorias, cardiovasculares y autoinmunes ^[8].



Figura 1. Esquema de efectos de los pesticidas sobre la salud. Fuente: Elaboración propia (Power Point).

1.4. Legislación y Límites Máximos de Residuos

Ante la evidencia de los riesgos para la salud asociados a la exposición a pesticidas, distintos organismos han desarrollado marcos regulatorios destinados a garantizar la seguridad de los productos de origen vegetal, estableciendo concentraciones máximas de residuos que no supongan un riesgo para la población.

En la Unión Europea, toda sustancia activa destinada a productos fitosanitarios debe ser evaluada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) antes de su aprobación por la Comisión Europea ^[9]. El Reglamento (CE) nº 396/2005 establece los Límites Máximos de Residuos (LMR) para estas sustancias y fija un valor genérico de 0,01 mg/kg para aquellas no autorizadas debido a su elevada toxicidad ^[10].

En los productos vegetales transformados, los procesos de extracción pueden concentrar los residuos presentes en la materia prima, por lo que su control debe ajustarse al uso previsto del producto. Mientras los extractos destinados a la industria nutracéutica se regulan mediante la normativa alimentaria, los de uso fitoterapéutico deben cumplir los requisitos de la Farmacopea Europea ^[11].

Dado que ambas normativas exigen mantener niveles muy bajos de residuos, resulta imprescindible disponer de métodos analíticos con límites de cuantificación suficientemente bajos para su determinación en matrices complejas.

1.4.1. Pesticidas tóxicos que se usan comúnmente

Pese a la retirada o prohibición de determinados pesticidas debido a sus efectos adversos sobre la salud humana y el medio ambiente, algunos de estos compuestos siguen siendo detectados en matrices vegetales. Informes recientes publicados por organismos como la EFSA y PAN Europe, advierten que varios pesticidas prohibidos en la Unión Europea siguen presentes en la cadena agroalimentaria ^[12].

Como ejemplo, los pesticidas Linuron y Thiacloprid (Figura 2), ambos dentro de los analitos objeto de estudio de este trabajo, están asociados con efectos tóxicos para la reproducción, como disruptores endocrinos y además con elevado potencial carcinógeno. A pesar de su prohibición, siguen aplicándose en la agricultura europea mediante la utilización de autorizaciones de

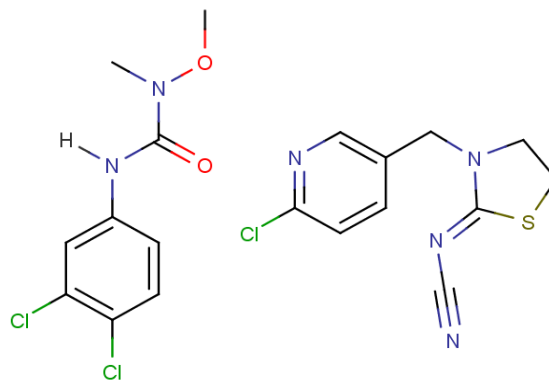


Figura 2. Estructuras químicas de Linuron (izquierda) y Thiacloprid (derecha).
Elaboración propia (MarvinSketch).

emergencia otorgadas por los Estados miembros de la UE, las cuales permiten el uso de estos pesticidas durante 120 días ^[13].

La constante reintroducción de estos y otros muchos pesticidas no autorizados como el Aldicarb, el Bendiocarb y el Imidacloprid ^[14] en la cadena agrícola hace indispensable la aplicación de métodos de análisis avanzados, como LC-MS/MS, con la sensibilidad y selectividad necesarias para detectar las trazas de estos residuos.

1.5. Extractos vegetales

El conflicto de los pesticidas no se limita al consumo de frutas, verduras u otros productos comestibles en la vida cotidiana. En el ámbito de la biotecnología y la industria farmacéutica también supone un obstáculo, dado que también usan las plantas y las someten a procesos de extracción de los que se obtienen compuestos bioactivos.

Los extractos vegetales son ampliamente utilizados en la industria biomédica y farmacéutica para tratar enfermedades, desarrollar suplementos nutracéuticos y formular productos cosméticos. Su interés comercial se debe a que pueden poseer actividad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, citotóxica o modular vías metabólicas ^[15].

A pesar de las restricciones, la persistencia ambiental de estos compuestos provoca que sigan presentes en la materia prima. Por ello, se debe comprobar previamente la calidad química del extracto para poder garantizar la reproducibilidad experimental, la seguridad y la correcta interpretación de los resultados de los ensayos en los que se evalúan sus efectos. Para ello se realiza el análisis de la composición química de estos extractos y la presencia de contaminantes en ellos ^[7]. Estos residuos son potenciales contaminantes que pueden interferir en la respuesta experimental observada alterando la evaluación de la actividad del extracto. Debido a ello, la detección de los residuos de pesticidas en estas matrices mediante técnicas analíticas es un requisito esencial para asegurar la validez y la seguridad de la aplicación de estos extractos ^[16].

1.6. Técnicas analíticas

La determinación de estos contaminantes requiere técnicas analíticas con elevada sensibilidad y selectividad, capaces de detectar residuos presentes a nivel de trazas en matrices complejas. El desarrollo de técnicas analíticas de alta sensibilidad permite superar las limitaciones típicas de las técnicas cromatográficas clásicas. Monitorizar residuos en extractos vegetales supone un gran desafío, ya que los compuestos de interés se encuentran a concentraciones muy bajas en el rango de µg/kg o ppb. Conociendo estas dificultades, la cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) se consolida como la técnica más eficiente para la detección de estos

residuos de pesticidas ^[17-19]. Este sistema instrumental tiene tres componentes fundamentales (Figura 3): Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (UHPLC), Ionización por Electrospray y Espectrometría de Masas en Tándem.

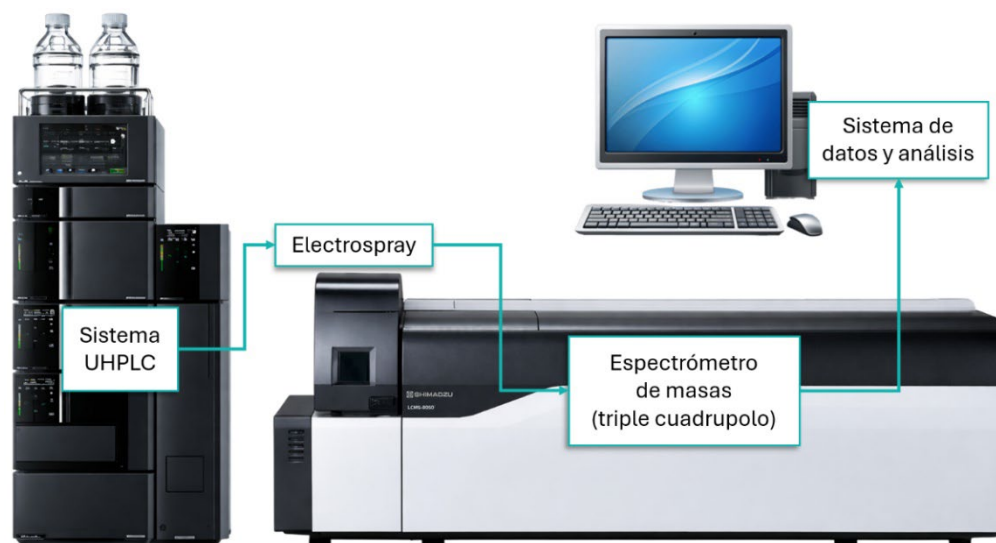


Figura 3. Diagrama de bloques del sistema UHPLC/MS.
Fuente: Elaboración propia (PowerPoint).

1.6.1. Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución (UHPLC)

El primer paso del análisis consiste en separar la mezcla compleja de compuestos presentes en el extracto vegetal. En el UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) esto se consigue impulsando la muestra líquida a través de una columna empacada con partículas microscópicas que constituyen la fase estacionaria. La separación se fundamenta en la migración diferencial de los analitos, que viene determinada por las interacciones fisicoquímicas entre las moléculas del pesticida, la fase móvil y la fase estacionaria.

Gracias al pequeño tamaño de las partículas que componen la fase estacionaria esta técnica cromatográfica ofrece varias ventajas respecto a otras más tradicionales, pues permite obtener picos más estrechos y una mejor separación de los analitos que tienen estructuras similares o isómeros, ofreciendo así un análisis más rápido y eficiente. La velocidad lineal es la rapidez con la que los analitos atraviesan la columna, lo que define su tiempo de retención (t_R). Este registra el intervalo desde la inyección hasta la elución del máximo del pico en el detector, actuando como la "huella dactilar" cualitativa de cada pesticida bajo condiciones controladas. El tiempo de retención debe ser reproducible, de forma que permita asignar cada analito con su estándar analítico ^[20].

Como consecuencia del elevado empaquetamiento, el sistema debe ser capaz de vencer una gran resistencia al flujo, lo que genera presiones que pueden alcanzar hasta los 20.000 psi.

Esto posibilita el uso de velocidades lineales más altas sin perder eficiencia, reduciendo el tiempo de análisis ^[21].

1.6.2. Ionización por Electrospray (ESI)

Para el análisis mediante espectrometría de masas es necesario que los analitos se encuentren en fase gaseosa y en condiciones de alto vacío, mientras que la cromatografía líquida proporciona una muestra disuelta en un disolvente líquido. Para resolver esta incompatibilidad se emplea la ionización por electrospray (ESI), que actúa como interfase entre ambas técnicas.

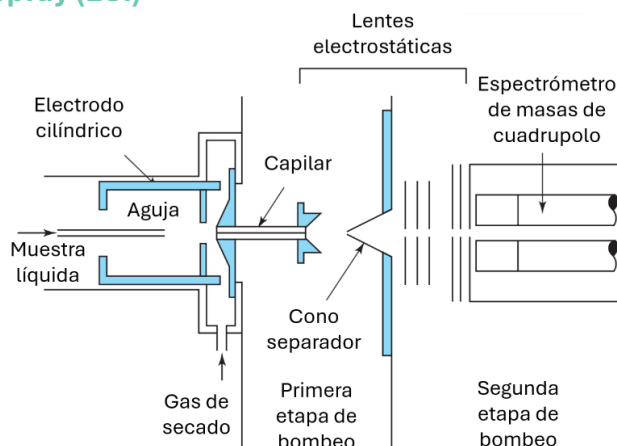


Figura 4. Esquema de la ionización por electrospray. Fuente: Adaptado de Skoog et al.

En este proceso, el eluyente atraviesa una aguja capilar sometida a un elevado potencial eléctrico, generando una nube de gotas finamente nebulizadas y altamente cargadas mediante un flujo de gas inerte (N_2). Durante la desolvatación, el disolvente se evapora progresivamente y la densidad de carga aumenta hasta alcanzar el límite de Rayleigh, momento en el que se produce la explosión coulombica y la liberación de los iones del analito en fase gaseosa (Figura 4).

La principal ventaja de la ESI es que constituye una técnica de ionización suave, ya que transfiere poca energía al analito y preserva la integridad del ion molecular, favoreciendo la formación de aductos y permitiendo una detección más fiable ^[22,23].

1.6.3. Espectrometría de Masas en Tándem (MS/MS)

La identificación de compuestos basada únicamente en el tiempo de retención resulta insuficiente en matrices complejas como los extractos vegetales, donde es frecuente la coelución de múltiples compuestos. Por ello, el sistema cromatográfico se acopla a un espectrómetro de masas en tándem (MS/MS), que permite identificar los analitos según sus características estructurales, aumentando la selectividad y sensibilidad del análisis.

La espectrometría de masas en tándem se basa en la selección de un ion precursor, su fragmentación mediante disociación inducida por colisión (CID) y el análisis de los iones producto generados. El espectrómetro de triple cuadrupolo (QqQ), ampliamente utilizado en el análisis multiresiduo de pesticidas, está formado por tres elementos principales (Figura 5) ^[24]:

- Primer Cuadrupolo (Q1): Actúa como un filtro de masas que selecciona el ion de interés (ion precursor).
- Celda de Colisión (q2): Es un cuadrupolo operado únicamente en modo de radiofrecuencia (RF) donde ocurre la CID con un gas inerte (como el argón) fragmentando en iones productos.
- Tercer Cuadrupolo (Q3): Permite el análisis de masas de los iones producto formados, permitiendo su detección selectiva.

Este sistema permite utilizar el modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), basado en el seguimiento simultáneo de múltiples transiciones precursor-producto durante la separación cromatográfica. Esta estrategia proporciona una elevada sensibilidad y selectividad al reducir el ruido de fondo y detectar únicamente las transiciones características de cada analito^[25].

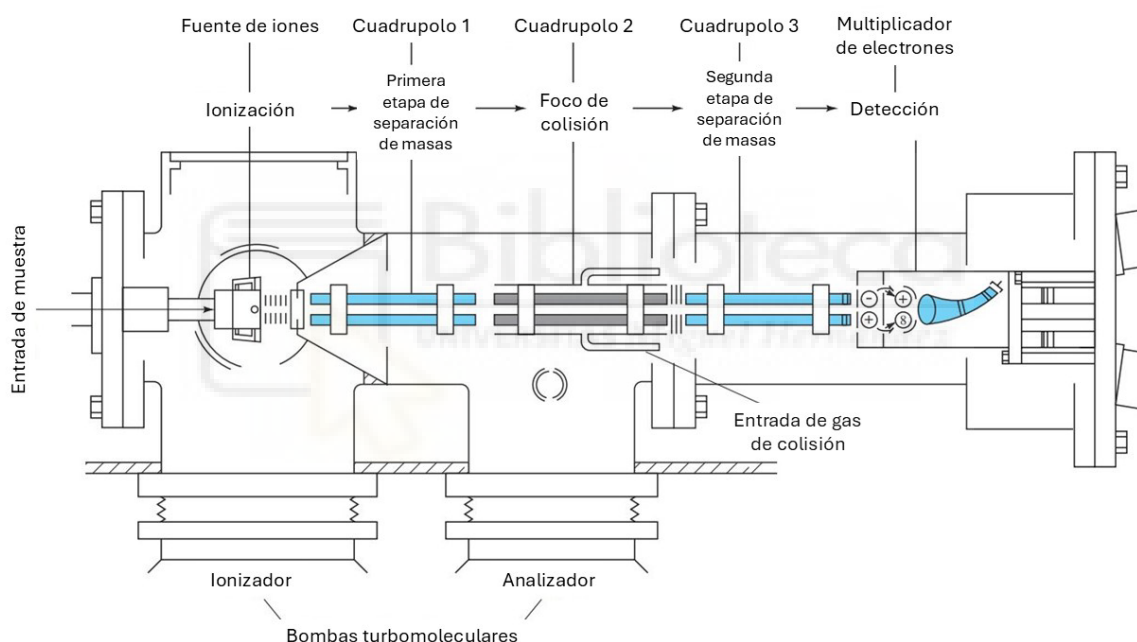


Figura 5. Esquema de un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. Fuente: Adaptado de Skoog et al.

1.7. Guía SANTE

La guía SANTE es un documento con orientaciones destinadas a los laboratorios que participan en el control oficial de los residuos de plaguicidas en los alimentos y los piensos en toda la Unión Europea (UE). En el documento SANTE/11312/2021 se describen los requisitos de validación de métodos y de control de calidad analítica (AQC) para respaldar la validez de los datos comunicados en el marco de los controles oficiales de residuos de plaguicidas. Estos datos, que se remiten a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), constituyen la base científica para comprobar el cumplimiento de los Límites Máximos de Residuos (LMR),

aplicar medidas de ejecución y evaluar la exposición real de los consumidores. Entre los principales requisitos establecidos por la guía destacan^[26]:

- Muestreo, transporte y preparación de muestras, garantizando su integridad desde la recogida hasta el análisis.
- Análisis e identificación de los analitos, definiendo los criterios cromatográficos y espectrométricos necesarios para su correcta identificación, incluyendo la coincidencia del tiempo de retención, el empleo de al menos dos transiciones MRM y un *ion ratio* dentro de los márgenes aceptados.
- Validación y control de calidad, estableciendo los criterios mínimos de rendimiento del método, como recuperaciones comprendidas entre el 70 y el 120 % y una desviación estándar relativa de repetibilidad (RSDr) $\leq 20\%$ para garantizar una precisión adecuada.

1.7.1. Efecto matriz

La guía SANTE le dedica una atención especial al efecto matriz, pues se considera uno de los mayores problemas de exactitud cuando se utiliza el análisis LC-MS/MS en muestras biológicas complejas.

Este fenómeno consiste en el aumento o supresión de la señal de los iones debido al efecto de los compuestos co-eluyentes presentes en la muestra, afectando en gran medida a la eficacia de ionización y a la sensibilidad del método. La gravedad de los efectos de la matriz depende directamente del rendimiento cromatográfico debido principalmente a la complejidad de las muestras y a las características de la instrumentación usada^[27].

Concretamente, al usar extractos vegetales para analizar su contenido de residuos de pesticidas, la elevada concentración de metabolitos secundarios, lípidos y pigmentos acentúa el efecto matriz. Durante la desolvatación en la fuente ESI, los compuestos de la matriz que salen de la columna junto al pesticida compiten con él por las cargas eléctricas, provocando que el pesticida no ionice adecuadamente, subestimando la concentración real del residuo. Además, los fragmentos de la matriz elevan el ruido químico basal, haciendo que el límite de detección (LOD) real empeore^[28].

Por tanto, es preciso resolver estos problemas si los hay, para evitar resultados falsos positivos o falsos negativos en el valor del límite máximo de residuos (LMR). Para ello, se aplican estrategias analíticas de mitigación como optimizar las etapas de limpieza o diluir el extracto. Solo asegurando la inequívoca determinación cuantitativa de los residuos en el extracto vegetal será posible evaluar de manera fiable y sin sesgos químicos los efectos que estos contaminantes puedan causar en los posteriores modelos de estudio *in vitro* e *in vivo*^[29].

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En el grupo de Diseño y Desarrollo de Moléculas del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE) se investiga la actividad biológica de compuestos bioactivos de origen natural con potencial en aplicaciones biomédicas, cosméticas y nutraceuticas. Para ello, se emplean extractos vegetales cuya actividad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana o citotóxica es evaluada mediante diferentes modelos experimentales.

Aunque los extractos utilizados actualmente proceden principalmente de cultivos a pequeña escala, una futura producción industrial implicaría el empleo de materias primas obtenidas mediante sistemas agrícolas convencionales, donde el uso de pesticidas es habitual. En este contexto, la posible presencia de residuos de pesticidas en los extractos podría comprometer su calidad química e interferir en la interpretación de los ensayos biológicos, dificultando la atribución de los efectos observados exclusivamente a los compuestos bioactivos.

Con el fin de disponer de una herramienta que permita controlar este posible factor de confusión, el objetivo general de este Trabajo de Fin de Grado fue desarrollar y validar un método analítico multirresiduo mediante UHPLC-MS/MS para la determinación de residuos de pesticidas en extractos vegetales, contribuyendo al control de la calidad química de estas matrices y la fiabilidad de los estudios biológicos realizados con ellas.

Para alcanzar este propósito, se han planteado los siguientes objetivos más específicos:

1. Generar una base de datos que comprenda los datos relevantes de los 203 analitos: sus transiciones MRM, tiempos de retención y posibles metabolitos.
2. Optimizar las condiciones analíticas del sistema UHPLC-MS/MS para maximizar la sensibilidad, selectividad y reproducibilidad del método analítico.
3. Desarrollar una herramienta informática para automatizar el tratamiento de los datos experimentales y el cálculo de los principales parámetros de validación analítica, facilitando el procesamiento y la interpretación de los resultados.
4. Aplicar el método desarrollado al análisis de extractos vegetales reales con el fin de demostrar su aplicabilidad en matrices de interés biotecnológico.
5. Evaluar la adecuación de la sensibilidad del método para su aplicación en estudios biológicos mediante una aproximación toxicológica basada en la comparación entre las concentraciones detectables y las concentraciones con efecto citotóxico descritas en la literatura.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos y estándares analíticos

Para la identificación y cuantificación de los residuos de pesticidas se emplearon estándares de referencia de alta pureza. Los estándares de referencia certificados de los pesticidas se obtuvieron a partir del kit comercial LC Multiresidue Pesticide Standards Kit (Cat. No. 31971, Restek Corporation, Bellefonte, PA, EE. UU.). Este kit comercial consta de un set de 10 mezclas independientes, a partir de las cuales se seleccionaron 8 (Tabla 1) que contienen entre todas 203 pesticidas puros, objetivo del estudio ^[30].

Número de mezcla	Referencia	Número de pesticidas
#1	# 31972	13
#2	# 31973	16
#3	# 31974	38
#4	# 31975	63
#5	# 31976	30
#6	# 31977	28
#7	# 31978	7
#9	# 31980	7

Tabla 1. Relación de mezclas (o mix) de estándares certificados, referencias de catálogo y número de analitos incluidos en el kit multiresiduo para LC-MS/MS.

Esta es la lista con los nombres de los 203 pesticidas empleados en el trabajo:

Abamectin	Dimethomorph	Imidacloprid	Propargite
Acephate	Dimoxystrobin	Ipconazole	Propham
Acetamiprid	Diniconazole	Iprovalicarb	Propiconazole
Acibenzolar-S-methyl	Dinotefuran	Isocarbofos	Propoxur
Alanycarb	Dioxacarb	Isoprocarb	Prothioconazole
Aldicarb	Diuron	Isoproturon	Pymetrozine
Aldicarb-sulfone	Doramectin	Ivermectine	Pyracarbolid
Aldicarb-sulfoxide	Emamectin benzoate a	Kresoxim-methyl	Pyraclostrobin
Ametryn	Emamectin benzoate b	Linuron	Pyridaben
Aminocarb	Epoxiconazole	Lufenuron	Pyrimethanil
Amitraz	Eprinomectin	Mandipropamid	Pyriproxyfen
Azoxystrobin	Etaconazole	Mefenacet	Quinoxifen
Benalaxyl	Ethiofencarb	Mepanipyrim	Rotenone
Bendiocarb	Ethiprole	Mepronil	Secbumeton
Benfuracarb	Ethirimol	Mesotrione	Siduron
Benzoximate	Ethofumesate	Metaflumizone	Simetryn
Bifenazate	Etoxazole	Metalaxyl	S-Indoxacarb
Bitertanol	Famoxadone	Metconazole	Spinetoram
Boscalid	Fenamidone	Methabenzthiazuron	Spinosad
Bromuconazole	Fenarimol	Methamidophos	Spirodiclofen

Bupirimate	Fenazaquin	Methiocarb	Spiromesifen
Buprofezin	Fenbuconazole	Methomyl	Spirotetramat
Butafenacil	Fenhexamid	Methoprotryne	Spiroxamine
Butocarboxim	Fenobucarb	Methoxyfenozide	Sulfentrazone
Butocarboxim-sulfoxide	Fenoxycarb	Metobromuron	Tebuconazole
Carbaryl	Fenpropimorph	Metribuzin	Tebufenozide
Carbetamide	Fenpyroximate	Mevinphos	Tebufenpyrad
Carbofuran	Fenuron	Mexacarbate	Tebuthiuron
Carbofuran-3-hydroxy	Fipronil	Monceren (Pencycuron)	Teflubenzuron
Carboxin	Flonicamid	Monocrotophos	Temephos
Carfentrazone-ethyl	Fluazinam	Monolinuron	Terbumeton
Chlorantraniliprole	Flubendiamide	Moxidectin	Terbutryn
Chlorfluazuron	Fludioxonil	Myclobutanil	Tetraconazole
Chlorotoluron	Flufenacet	Neburon	Thiabendazole
Chloroxuron	Flufenoxuron	Nitenpyram	Thiacloprid
Clethodim	Fluometuron	Novaluron	Thiamethoxam
Clofentezine	Fluoxastrobin	Nuarimol	Thidiazuron
Clothianidin	Fluquinconazole	Omethoate	Thiobencarb
Cyazofamid	Flusilazole	Oxadixyl	Thiofanox
Cycluron	Flutolanil	Oxamyl	Thiophanate-methyl
Cymoxanil	Flutriafol	Paclobutrazol	Triadimefon
Cyproconazole	Forchlorfenuron	Penconazole	Triadimenol
Cyprodinil	Formetanate	Phenmedipham	Trichlorfon
Cyromazine	Fuberidazole	Picoxystrobin	Tricyclazole
Desmedipham	Furalaxyl	Piperonyl butoxide	Trifloxystrobin
Diclobutrazol	Furathiocarb	Pirimicarb	Triflumizole
Dicrotophos	Halofenozide	Prochloraz	Triflumuron
Diethofencarb	Hexaconazole	Promecarb	Triticonazole
Difenoconazole	Hexaflumuron	Prometon	Vamidothion
Diflubenzuron	Hexythiazox	Prometryn	Zoxamide
Dimethoate	Imazalil	Propamocarb	

Las mezclas #8 y #10 no se incluyeron por falta de disponibilidad, además de que cada una de ellas solo contenía un pesticida. Todas las soluciones madre comerciales se encontraban a una concentración certificada de 100 µg/mL en acetonitrilo y se almacenaron en oscuridad a una temperatura inferior a -10 °C antes de la preparación de las soluciones de trabajo. Estas mezclas de estándares tienen las siguientes aplicaciones en el desarrollo del método:

- Identificación y Optimización de Transiciones MRM: Con cada mix se consigue identificar los tiempos de retención específicos y optimizar las transiciones de monitorización de reacciones múltiples (MRM) en el espectrómetro de masas de cada residuo de pesticida simultáneamente.

- Rectas de Calibración: Con todos los mix se preparan las diluciones seriadas con las que se construyen las curvas de calibración, se evalúa la linealidad del método y se cuantifican las concentraciones en las muestras reales.

El disolvente empleado con los kits es el acetonitrilo (J.T. Baker, UN1648), usado para el análisis de pesticidas debido a que ofrece varias ventajas. En cuanto al proceso de extracción de la muestra, consigue desnaturalizar y precipitar proteínas indeseadas. Además, supone una mayor eficiencia en la fuente de ionización, al poseer una elevada volatilidad, lo que hace que se evapore rápidamente. Incluso, su baja viscosidad permite que en la cromatografía los picos sean más definidos.

3.2. Instrumentación y condiciones analíticas

El análisis de los residuos de pesticidas se llevó a cabo utilizando un sistema de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) modelo Nexera (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Tokio, Japón). La configuración del sistema incluye un degasificador DGU-405, una bomba binaria LC-40D ×3, un inyector automático SIL-40C, un horno de columna CTO-40C y un controlador de sistema CBM-40.

Para la separación cromatográfica, se empleó una columna *Poroshell* 120 SB-C18 (4,6 x 150 mm, 2,7 µm) (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, EE. UU.), caracterizada por el uso de partículas superficialmente porosas que permiten obtener una alta eficiencia con presiones de operación moderadas. Como fases móviles se utilizaron agua 0,1% de ácido fórmico (Fase A), y acetonitrilo 0,1% de fórmico (Fase B) y se aplicó el siguiente gradiente:

Tiempo (min)	Flujo	%Fase A	%Fase B
0,00	0,25	90	10
2,00	0,25	90	10
10,00	0,25	65	35
25,00	0,25	30	70
30,00	0,25	0	100
34,00	0,25	0	100
38,00	0,25	90	10
40,00	0,25	90	10

Tabla 2. Condiciones del gradiente de elución por fases móviles para la separación cromatográfica.

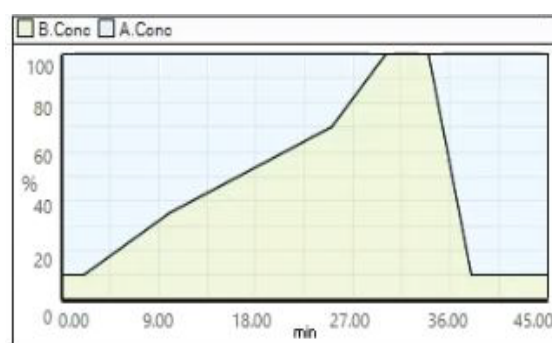


Figura 6. Perfil del gradiente de elución en LabSolutions.

La detección y cuantificación se realizaron mediante un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Shimadzu LCMS-8050 (Shimadzu, Kioto, Japón) equipado con una fuente de ionización por electrospray. El instrumento se operó en modos de ionización por electrospray positivo y negativo (ESI+ y ESI-) con adquisición en modo de monitorización de reacción múltiple (MRM), optimizando de esta forma la detección de pesticidas de distinta naturaleza química en una sola carrera analítica.

Los parámetros de la fuente de ionización se optimizaron para maximizar la sensibilidad de los analitos:

- Voltaje de la interfaz: 4,0 kV.
- Temperaturas: Interfaz a 300 °C, línea de desolvatación (DL) a 300 °C y bloque de calentamiento a 400 °C.
- Flujos de gas: Gas de secado (N₂) a 10 L/min, gas nebulizador (N₂) a 3 L/min y gas de calentamiento (aire sintético) a 10 L/min.
- Gas de colisión: Argón (Ar) a una presión de 230 kPa.

Las transiciones MRM, definidas como pares de ion precursor e ion producto, se anotaron en la base de datos (Anexo 1) y en los casos en que no había información se utilizó la opción de optimización automática por *Product Ion Scan* que incluye el software Shimadzu LabSolutions, con el que se realizó la adquisición y el procesamiento de los datos (versión V5.109).

Aunque inicialmente el estudio se planteó para un total de 203 pesticidas, durante la optimización instrumental se observó que 35 de ellos presentaban una respuesta cromatográfica y espectrométrica insuficiente para cumplir los requisitos mínimos de sensibilidad necesarios para su validación. Dado que la baja intensidad de señal impedía una cuantificación fiable dentro de las condiciones analíticas establecidas, estos compuestos no se incluyeron en la fase de validación del método. Su incorporación requerirá una reoptimización específica de los parámetros instrumentales o el desarrollo de estrategias adicionales, como procedimientos de concentración de muestra o modificaciones del método cromatográfico, con el fin de mejorar su respuesta analítica.

3.3. Preparación de las Rectas de Calibración

Para cuantificar los residuos de pesticidas presentes en los extractos vegetales es necesario disponer de curvas de calibración que permitan interpolar la respuesta instrumental, es decir, el área del pico cromatográfico para cada analito para calcular su concentración. Con este propósito se prepararon disoluciones patrón en acetonitrilo a diferentes niveles de concentración para preparar una recta de calibración y obtener la ecuación de la recta.

Con las mezclas comerciales (con los pesticidas a una concentración de 100 µg/mL en acetonitrilo) se preparó una solución multirresiduo (*Stock 1*), combinando 100 µL de cada una de las 8 mezclas con 200 µL de acetonitrilo de grado LC-MS. En esta primera preparación los analitos de las mezclas originales presentaban un factor de dilución de 1:10. A partir de la solución *Stock 1* se preparó una dilución seriada con factor de dilución 1:2. Se obtuvo de esta forma un total de 20 viales, incluyendo el *Stock 1* y otro vial con tan solo el disolvente (Figura 6). La concentración de pesticidas en cada vial queda reflejada en la Tabla 3.

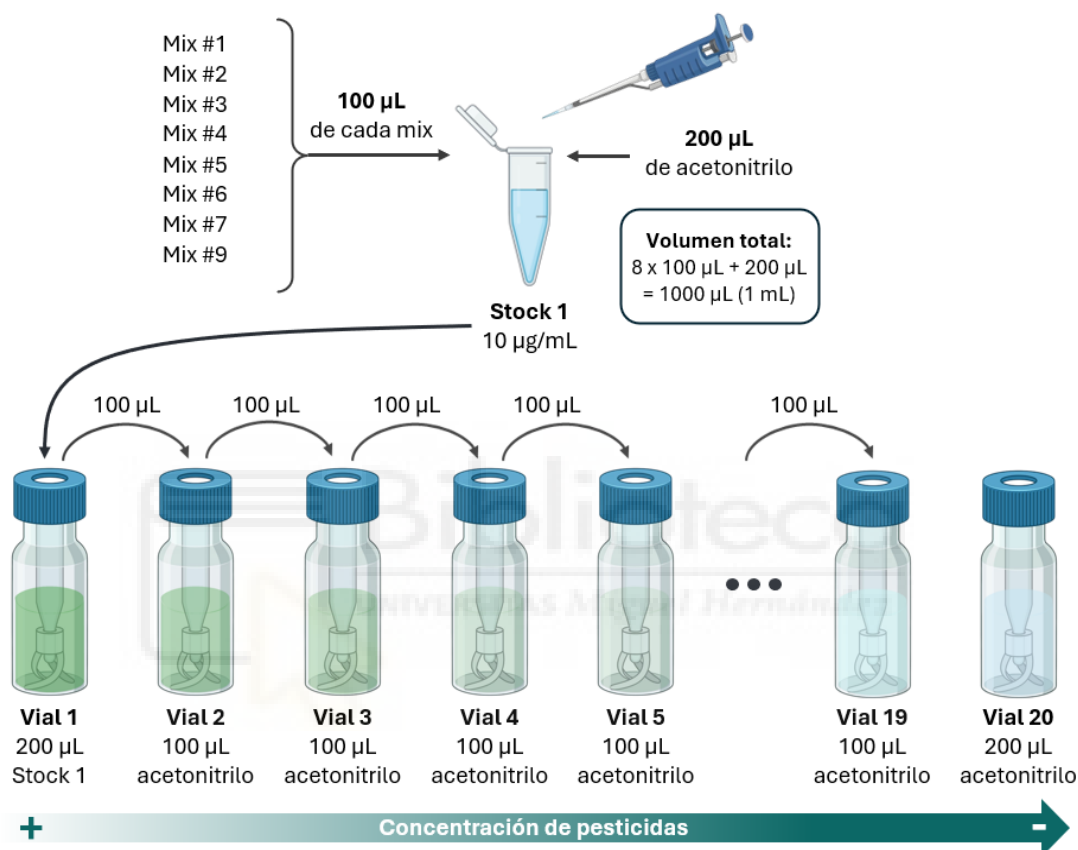


Figura 7. Esquema del procedimiento de preparación de las diluciones seriadas en viales HPLC para el análisis de mezclas de pesticidas. Fuente: Elaboración propia (BioRender).

Vial 1	Vial 2	Vial 3	Vial 4	Vial 5
10	5	2.5	1.25	0.625
Vial 11	Vial 6	Vial 7	Vial 8	Vial 9
0.009766	0.312500	0.156250	0.078125	0.039063
Vial 10	Vial 12	Vial 13	Vial 14	Vial 15
0.019531	0.004883	0.002441	0.001221	0.000610
Vial 16	Vial 17	Vial 18	Vial 19	Vial 20
0.000305	0.000153	0.000076	3.8147E-05	0

Tabla 3. Concentración en µg/mL de pesticida en cada vial de la dilución seriada.

Posteriormente, cada una de las disoluciones fue inyectada en el sistema LC-MS/MS bajo las condiciones instrumentales previamente optimizadas. El procesamiento de los cromatogramas y la construcción de las curvas de calibración se llevaron a cabo mediante el módulo *Quant Browser* del software LabSolutions, correlacionando la concentración con el área de los picos cromatográficos correspondientes a las transiciones MRM seleccionadas. Aunque el software realizó una integración automatizada de las señales, en aquellos casos donde la delimitación de la línea base no fue óptima debido al ruido de fondo o a la morfología del pico, se procedió a realizar una integración manual, asegurando así la máxima precisión en la determinación de las áreas.

Además, para evaluar la estabilidad de los analitos en las disoluciones patrón y garantizar la robustez de este método frente al almacenamiento, los puntos de la recta de calibración fueron sometidos a diferentes condiciones temporales y térmicas. Para los ensayos de estabilidad, las disoluciones se mantuvieron en condiciones de refrigeración (aproximadamente 4 °C) y fueron analizadas tras transcurrir 24 horas y 1 mes desde su preparación.

3.4. Extractos

Una vez caracterizados los parámetros de cada pesticida objetivo, se procedió a procesar e inyectar los extractos para monitorizar y detectar la posible presencia de trazas de pesticidas en las matrices. Dado que ambos extractos empleados tienen fines similares, es esencial garantizar la ausencia de residuos en estas matrices, para que no supongan un riesgo para la salud del consumidor.

3.4.1. Viqua

Viqua® (adquirido a través de *InnovationLabo*), es un extracto orgánico, extraído de la granada Royal Rubis (de la variedad Mollar de Elche, cosechada en España). Está patentado y desarrollado comercialmente por *Sethic Innovations* en colaboración con *Japan Innovation Labo*.

Es un nutracéutico que se caracteriza por tener un perfil fitoquímico con un elevado contenido en compuestos polifenólicos bioactivos antioxidantes y antiinflamatorios, como la punicalagina. Este extracto destaca por haber conseguido reducir la generación de especies reactivas de oxígeno y la liberación de citoquinas inflamatorias en distintos modelos celulares.

Las características de este extracto lo hacen considerablemente útil como agente protector de la piel frente al daño solar y la hiperpigmentación, por ello se plantea su potencial como ingrediente en formulaciones dermatológicas y cosméticas ^[31].

Para su análisis instrumental mediante LC-MS/MS, el extracto se disolvió a una concentración final de 1 mg/mL utilizando como vehículo de inyección una mezcla de agua y acetonitrilo (agua:ACN, 95:5, v/v).

3.4.2. Paja de arroz

El extracto de paja de arroz surge de los proyectos STRAW4FOOTWEAR y BioTECH-RICE cuyo objetivo es transformar la paja de arroz en biomateriales e ingredientes de alto valor para la industria cosmética y del calzado.

Buscan extraer compuestos bioactivos presentes en la paja de arroz mediante tecnologías de extracción sostenibles, purificar y concentrar los compuestos para obtener ingredientes funcionales que se puedan aplicar en distintos sectores. En cuanto a su fin cosmético, el extracto de paja de arroz contiene moléculas fenólicas y otros compuestos naturales de los que se investiga su actividad antioxidante, antiinflamatoria y antienvjecimiento.

En este caso, para el análisis instrumental, el extracto se disolvió a una concentración final de 1 mg/mL utilizando como vehículo de inyección una mezcla de dimetilsulfóxido y acetonitrilo (DMSO:ACN, 1:9, v/v).

3.5. Validación del método analítico

3.5.1. Parámetros de validación del método

Para evaluar la viabilidad del método cromatográfico se determinaron los siguientes parámetros analíticos [26,32,33]:

1. **Exactitud:** Cercanía del resultado obtenido respecto al valor verdadero. Este parámetro se evalúa analizando muestras de concentración conocida, es decir, mediante los estándares de referencia. Esta evaluación debe realizarse abarcando de 3 a 5 niveles de concentración diferentes y asegura que los componentes de la muestra no alteran la respuesta instrumental. Se expresa mediante el porcentaje de recuperación:

$$\% \text{ Recuperación} = \left(\frac{\text{Valor Medido}}{\text{Valor Verdadero}} \right) \times 100$$

2. **Precisión:** Evalúa la dispersión de los resultados entre ensayos independientes y se expresa habitualmente como el Porcentaje de Desviación Estándar Relativa (%RSD):

$$\% \text{ RSD} = \left(\frac{SD}{Media} \right) \times 100$$

3. **Linealidad:** Capacidad del método analítico para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra. Su evaluación requiere la preparación de varios niveles de concentración, graficando el área del pico

cromatográfico frente a la concentración correspondiente. El criterio de aceptación matemática para verificar una proporcionalidad lineal adecuada requiere que el coeficiente de determinación (R^2) sea igual o superior a 0.99:

$$y = mx + b$$

4. Límites de Detección y Cuantificación: parámetros estadísticos fundamentales para determinar la sensibilidad y el alcance operativo del método analítico:

- **Límite de Detección (LOD):** cantidad mínima de analito presente en una muestra que puede ser detectada con certeza, pero no necesariamente cuantificada de forma exacta.
- **Límite de Cuantificación (LOQ):** concentración más baja del analito que puede ser determinada cuantitativamente con un nivel adecuado de precisión y exactitud.

Considerando la desviación estándar de la respuesta analítica como σ y la pendiente de la curva de calibración como S , los límites se calculan mediante estas relaciones:

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{S} \quad LOQ = \frac{10 \sigma}{S}$$

3.5.2. Tratamiento automatizado de datos y análisis estadístico

Con el fin de manejar el tratamiento de los datos generados por el software LabSolutions se desarrolló un entorno informático personalizado para esta labor en el entorno Google Colab, mediante lenguaje de programación Python 3. Para su construcción, se empleó inteligencia artificial como apoyo en el proceso de programación. El script constó de los siguientes pasos:

- 1. Definición de objetivos y parámetros de validación:** Se establecieron los parámetros de validación del método cromatográfico que debían calcularse automáticamente a partir de los datos experimentales: la linealidad, los límites de detección y cuantificación, la especificidad, la exactitud, la precisión, la robustez y la estabilidad del método analítico.
- 2. Estructuración del algoritmo y preparación de los datos:** Se diseñó la organización de los archivos de entrada para que el programa pudiera identificar automáticamente los distintos compuestos y procesar la información correspondiente a cada uno de ellos (Anexo 2). Además, se estableció el blanco cromatográfico (sin analito), mediante valores con concentración teórica igual a 0.
- 3. Adaptación de la estructura de lectura de datos:** Se ajustó la importación de archivos y la gestión de variables para garantizar la correcta lectura y organización de la información experimental dentro del entorno Google Colab.
- 4. Automatización y formateo del informe de resultados:** Para mostrar los resultados estadísticos, se incorporó un módulo de generación automática de informes en formato

Excel (Anexo 3). Este módulo permitió organizar los resultados de la validación de forma estructurada para su revisión y presentación.

5. **Integración del módulo de cuantificación:** Se incorporó una herramienta de cuantificación basada en las rectas de calibración obtenidas de cada compuesto. De esa forma, el script pudo utilizarse para calcular las concentraciones en las muestras reales en función del área del pico, incluyéndose estos resultados en el informe de Excel.
6. **Ensamblaje final y optimización del script:** Se integraron cada uno de los módulos explicados en un único script (Anexo 4), del que se revisó su funcionamiento y asegurando la correcta ejecución de las etapas de procesamiento, validación, cuantificación y generación de informes.

3.5.3. Evaluación de la adecuación toxicológica del método para ensayos celulares

Además de la validación analítica convencional, se realizó una evaluación teórica con el objetivo de determinar si la sensibilidad alcanzada por el método UHPLC-MS/MS era suficiente para garantizar su aplicación en extractos vegetales destinados a ensayos *in vitro*.

Para ello, se recopiló mediante revisión bibliográfica la concentración mínima descrita en la literatura capaz de inducir efectos citotóxicos para cada uno de los pesticidas incluidos en la validación del método. Estos valores se compararon con la concentración máxima que cada pesticida podría alcanzar en el medio de cultivo celular a partir de las concentraciones máximas cuantificables por el método analítico.

Con el fin de establecer un escenario conservador de exposición, se consideró una concentración de extracto de 250 µg/mL, correspondiente a una de las dosis más elevadas habitualmente empleadas en estudios de citotoxicidad con extractos vegetales.

Para estimar la concentración máxima potencial que cada pesticida podría alcanzar en el medio de cultivo se siguió un enfoque jerárquico. Cuando el pesticida fue cuantificado en los extractos analizados, se empleó la concentración experimental determinada, al representar la exposición más realista en las condiciones del estudio. En aquellos casos en los que el compuesto no pudo cuantificarse, bien por encontrarse por debajo del límite de cuantificación o por no haberse detectado en la muestra, se utilizó el correspondiente LOQ como estimación conservadora de la concentración máxima potencial. Este criterio garantiza que la evaluación no subestime la posible exposición celular y permite valorar la adecuación del método incluso en ausencia de cuantificaciones experimentales.

Posteriormente se calculó el Factor de Seguridad Toxicológica (FST) para cada pesticida mediante la siguiente expresión:

$$FST = \frac{\text{Concentración mínima con efecto citotóxico}}{\text{Concentración máxima potencial en el cultivo celular}}$$

Un valor de $FST > 1$ indica que la concentración máxima potencialmente alcanzable en el ensayo celular permanece por debajo de la concentración mínima descrita para producir efectos citotóxicos, mientras que valores más elevados representan un mayor margen de seguridad entre ambas concentraciones.



4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante el desarrollo y la validación del método analítico se presentan a continuación. En primer lugar, la Tabla 4 resume los principales parámetros de rendimiento alcanzados, que posteriormente se describen de forma individual. Estos resultados permiten valorar la capacidad del método para la determinación de residuos de pesticidas en extractos vegetales complejos.

Parámetro de validación	Resultado obtenido	Criterio SANTE
Pesticidas incluidos en la validación	168 de 203	—
Linealidad (R^2)	0,9905 – 0,9998	$\geq 0,99$
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	0,030 – 0,207	—
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	0,091 – 0,628	—
Precisión (%RSD)	0,34 – 28,86 (media: 6,21)	$\leq 20 \%$
Exactitud (%Recuperación)	77,83 – 122,22 % (media: 95,60 %)	70–120 %
Estabilidad 24 h (%Recuperación)	67,50 – 117,43 % (media: 91,62 %)	70–120 %
Estabilidad 1 mes (%Recuperación)	60,17 – 109,62 % (media: 85,73 %)	70–120 %

Tabla 4. Resumen de los principales parámetros obtenidos durante la validación del método UHPLC-MS/MS para la determinación de residuos de pesticidas en extractos vegetales.

4.1. Optimización del método UHPLC-MS/MS

Para poder llevar a cabo una detección selectiva de los analitos, se procedió antes a la optimización de las condiciones cromatográficas y de espectroscopía de masas. En una primera fase teórica, se elaboró una base de datos en formato Excel que incluyó un listado de los 203 pesticidas objetivo de este método. Para cada uno de los compuestos se incluyó la siguiente información: nombre del analito, mezcla estándar comercial (kit) de procedencia y los parámetros clave para su detección (la relación masa-carga (m/z) del ion precursor de cada pesticida, así como las relaciones m/z de sus correspondientes iones producto) (Anexo 1). Estos últimos se obtuvieron en la base de datos oficial de los Laboratorios de Referencia de la Unión Europea para Residuos de Pesticidas (EURL Data Pool).

Posteriormente, en la fase experimental, se prepararon disoluciones de trabajo a partir de las mezclas comerciales de pesticidas utilizando acetonitrilo como disolvente. Estas mezclas de estándares se inyectaron en el equipo LC-MS/MS. El objetivo de esta inyección fue determinar el tiempo de retención (T_R) específico para cada uno de los 203 pesticidas (Figura 8) bajo las condiciones cromatográficas y de fase móvil establecidas. La obtención de estos tiempos de retención permitió completar la base de datos analítica, sentando las bases para la

programación del método de adquisición y el posterior procesamiento de las muestras de extractos vegetales.

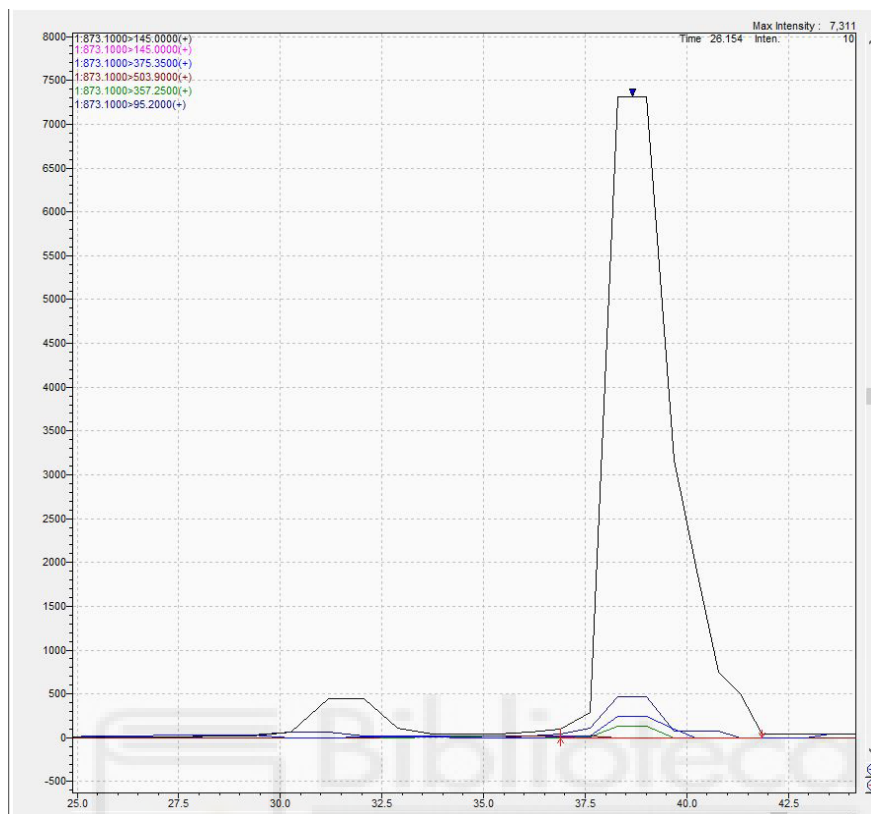


Figura 8. Cromatograma MRM del pesticida Abamectin. Fuente LabSolutions.

La información obtenida en esta fase inicial fue necesaria para desarrollar una primera versión del método analítico en LabSolutions. Este método continuó siendo optimizado progresivamente a medida que se obtenían nuevos datos experimentales, cambiando los ajustes de la ventana de temporal adquisición del cromatograma, reorganizando los eventos y asignando las transiciones MRM de los distintos compuestos.

4.2. Curvas de calibración y linealidad

El procedimiento empleado para la obtención de las curvas de calibración ya descrito en metodología permitió la obtención de las rectas empleando un total de 20 disoluciones del analito a distintas concentraciones. Con las rectas de calibrado en el método, se pudo obtener el valor de ordenada en el origen, la pendiente y el coeficiente de determinación (R^2), y con ello comprobar si los puntos del analito se ajustaban al modelo matemático de la ecuación y si había linealidad, definida anteriormente.

De los 203 pesticidas incluidos inicialmente en el estudio, únicamente se pudieron incluir las curvas de calibración para 168 compuestos. Los 35 pesticidas restantes se descartaron

debido a que presentaban una respuesta instrumental insuficiente bajo las condiciones de ionización empleadas. A pesar de que en algunos casos sí se observaba señal del analito, la intensidad registrada era muy baja, alcanzando valores máximos de 40 a 50 unidades. Estas señales no eran lo suficientemente altas para obtener rectas de calibración fiables, por lo que se optó por prescindir que dichos compuestos en el estudio de validación.

Para garantizar la linealidad de las rectas, se estableció como criterio que R^2 fuera igual o superior a 0,99. Esto se cumple todos los 168 pesticidas evaluados, obteniéndose valores de R^2 comprendidos entre 0,9905 y 0,9998, mostrando una excelente correlación entre la respuesta instrumental y la concentración del analito. Esta elevada linealidad confirma que el rango seleccionado de calibración ha sido adecuado, demostrando que el método da una respuesta proporcional a la concentración para todos los compuestos incluidos en la validación. Como ejemplo, en la Figura 9 se muestra la curva de calibración para uno de los pesticidas analizados, el Abamectin.

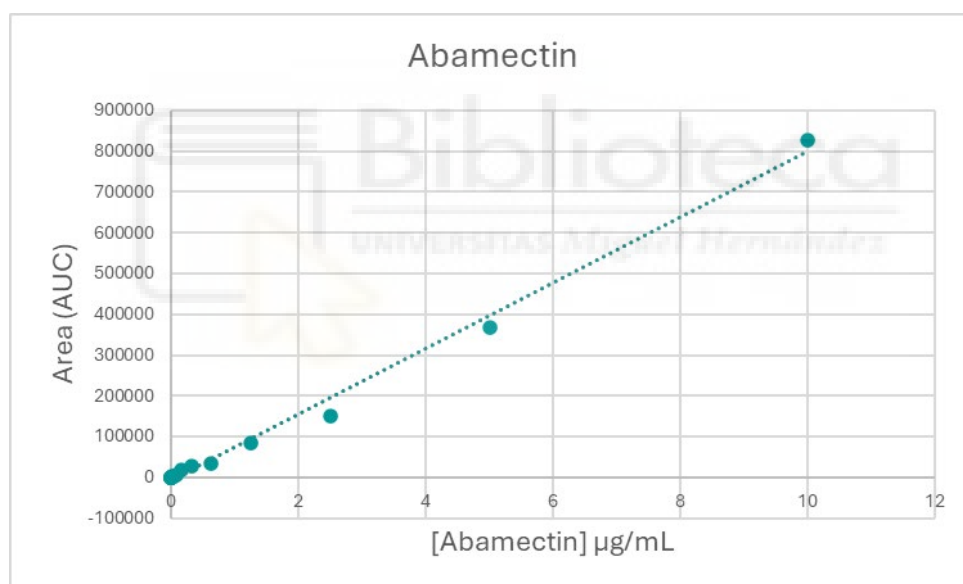


Figura 9. Recta de calibración del pesticida Abamectin.

4.3. Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se calcularon a partir de la desviación estándar de la respuesta analítica y de la pendiente de las curvas de calibración obtenidas para cada uno de los 168 pesticidas incluidos en la validación. Los valores de LOD oscilaron entre 0,030 y 0,207 µg/mL, y los valores de LOQ se situaron entre 0,091 y 0,628 µg/mL.

Estos valores se obtuvieron a partir de disoluciones patrón y, por tanto, representan los límites instrumentales de detección y cuantificación. No obstante, dado que el objetivo final del método es determinar residuos de pesticidas en extractos vegetales destinados a su evaluación

biológica, resulta necesario valorar si dicha sensibilidad es suficiente para garantizar una detección fiable en las condiciones reales de aplicación del método.

Con el fin de determinar si la sensibilidad del método desarrollado resulta adecuada para la evaluación de extractos vegetales destinados a ensayos *in vitro*, se compararon los límites de cuantificación obtenidos experimentalmente con la concentración mínima con efecto citotóxico descrita en la literatura para cada uno de los pesticidas incluidos en la validación.

Para ello se recopiló información bibliográfica correspondiente a los 168 pesticidas validados, seleccionando en cada caso la menor concentración capaz de inducir un efecto citotóxico significativo en modelos celulares (Anexo 5) ^[34,35]. Posteriormente se calculó la concentración máxima que podría alcanzar cada pesticida en el medio de cultivo suponiendo un escenario conservador, en el que el extracto se emplea a una concentración de 250 µg/mL, correspondiente a una de las dosis más elevadas habitualmente utilizadas en estudios de citotoxicidad.

Los resultados muestran que, para la gran mayoría de los pesticidas evaluados, la concentración máxima que podría alcanzarse en el cultivo celular permanece muy por debajo de la concentración mínima capaz de inducir efectos citotóxicos, indicando que la sensibilidad del método resulta suficiente para garantizar que los residuos detectables en los extractos no interfieran en la interpretación de los ensayos biológicos. Únicamente un número reducido de compuestos altamente citotóxicos presentaron márgenes de seguridad inferiores al resto, constituyendo los escenarios más conservadores de aplicación del método.

En conjunto, estos resultados demuestran que el método desarrollado no solo presenta una sensibilidad adecuada desde el punto de vista analítico, sino que también resulta apropiado para su uso previsto, permitiendo detectar y cuantificar residuos de pesticidas a concentraciones considerablemente inferiores a aquellas asociadas con efectos citotóxicos en modelos celulares.

4.4. Precisión y exactitud del método

La precisión del método se evaluó mediante el coeficiente de variación o %RSD obtenido para cada uno de los 168 pesticidas. Los valores oscilaron entre 0,34 y 28,86%, con un valor medio de 6,21%, indicando una buena reproducibilidad de las medidas. Además, el 97,6 % de los compuestos presentaron valores de %RSD inferiores al 20 %, cumpliendo con los criterios de aceptación establecidos por la guía SANTE. Únicamente cuatro pesticidas (Azoxystrobin, Carboxin, Doramectin e Isocarbofos) mostraron valores superiores a este límite, lo que podría atribuirse a una menor estabilidad de la señal analítica.

Por otro lado, la exactitud del método se calculó a partir de los porcentajes de recuperación obtenidos de cada pesticida. Estos valores se encontraron comprendidos entre 77,83 y 122,22%, con una recuperación media de 95,60%, lo que demuestra una concordancia entre las concentraciones teóricas y las experimentales. Por tanto, todas las recuperaciones medias de todos los analitos analizados se sitúan en el rango del 70 % al 120 % aceptado por la guía SANTE, excepto Prometryn que es superior al 120%.

4.5. Estabilidad de los patrones

Para determinar la estabilidad de las disoluciones patrón, se analizaron las muestras tras 24 horas y tras un mes de almacenamiento en refrigeración. A corto plazo, se demuestra que las disoluciones tienen una buena estabilidad, pues la recuperación media a 24 horas es del 91,6%, los valores se encuentran entre 67,50% y 117,43%, siendo solo 4 de los pesticidas los que tienen un valor inferior a 70%. Por lo general, estos resultados indican que la gran mayoría de los compuestos mantienen concentraciones próximas a las iniciales durante un día, lo que significa que las condiciones de almacenamiento son adecuadas.

A largo plazo, en cambio, la recuperación media baja a 85,73% cuando se almacenan durante un mes. En este caso los valores de recuperación oscilan entre 60,17 y 109,62%, siendo un total de 13 los pesticidas que se encuentran por debajo del 70% recomendado por la guía SANTE como mínimo de recuperación media. Esto indica que, a pesar de que la mayoría de los compuestos siga manteniendo una estabilidad aceptable tras un mes de almacenamiento, varios pesticidas mostraron una pérdida de señal significativa que sugiere la pérdida de estabilidad de estos compuestos en periodos prolongados de conservación.

4.6. Aplicación del método a los extractos vegetales

Con el método UHPLC-MS/MS validado se procedió al análisis de un extracto de paja de arroz (PASE) y de un extracto comercial de granada (Viqua), con el objetivo de determinar la presencia de residuos de pesticidas y evaluar la capacidad del método para su detección en matrices vegetales reales.

En el extracto de paja de arroz se detectaron señales correspondientes a 14 pesticidas, mientras que en el extracto comercial de granada se identificaron 11 compuestos. No obstante, la mayoría de las concentraciones determinadas se situaron por debajo del LOD, indicando que, aunque el método fue capaz de detectar la presencia de estos residuos, la incertidumbre asociada a su cuantificación impide considerarlos cuantificables con la precisión establecida durante la validación.

En la muestra de paja de arroz, los pesticidas detectados fueron Alanycarb, Aldicarb, Aldicarb-sulfone, Azoxystrobin, Bendiocarb, Butafenacil, Cyprodinil, Desmedipham, Diclobutrazol, Dicrotophos, Dimethoate, Emamectin benzoate a, Forchlorfenuron e Imidacloprid (9 de ellos no aprobados en la UE). Estos presentaron concentraciones inferiores al correspondiente LOD, por lo que únicamente puede afirmarse la existencia de una señal compatible con dichos compuestos.

En el extracto comercial Viqua se detectaron 11 pesticidas, todos ellos también con concentraciones inferiores al LOD del método. Los compuestos identificados fueron Aldicarb, Azoxystrobin, Bendiocarb, Butafenacil, Cyprodinil, Diclobutrazol, Dicrotophos, Dimethoate, Emamectin benzoate a, Forchlorfenuron e Imidacloprid. Aunque estas detecciones indican la presencia de residuos a nivel de trazas, las concentraciones registradas no permiten realizar una cuantificación fiable de acuerdo con los criterios de validación establecidos.

4.7. Evaluación de la adecuación toxicológica del método para ensayos celulares

Además de la validación analítica convencional, se realizó una evaluación de la adecuación del método para su aplicación en extractos vegetales destinados a ensayos *in vitro*. Esta aproximación permitió integrar la sensibilidad analítica del método con la información toxicológica disponible para cada uno de los pesticidas incluidos en la validación.

Para ello se recopiló la concentración mínima con efecto citotóxico descrita en la literatura para los 168 pesticidas evaluados y se comparó con la concentración máxima que cada compuesto podría alcanzar en el medio de cultivo considerando un escenario conservador de exposición, correspondiente a una concentración de extracto de 250 µg/mL, una de las dosis más elevadas habitualmente empleadas en estudios de citotoxicidad *in vitro*.

A partir de estos datos se calculó el Factor de Seguridad Toxicológica (FST), definido como la relación entre la concentración mínima con efecto citotóxico descrita en la literatura y la concentración máxima potencialmente alcanzable por el pesticida durante el tratamiento celular (Anexo 5).

Aunque el valor del FST fue variable entre compuestos, la mayoría de los pesticidas presentaron márgenes de seguridad elevados, indicando que las concentraciones máximas previsibles durante los ensayos celulares permanecen considerablemente por debajo de aquellas asociadas con efectos citotóxicos descritos experimentalmente. Únicamente un reducido número de compuestos presentó los márgenes de seguridad más bajos (FST<1), correspondiendo principalmente a pesticidas descritos previamente como altamente

citotóxicos, entre ellos Rotenone, Pyraclostrobin, Fipronil, Ivermectin, Fenazaquin y Fenpyroximate.

Estos resultados indican que la sensibilidad alcanzada mediante el método UHPLC-MS/MS no solo resulta adecuada desde el punto de vista instrumental, sino que también permite detectar residuos de pesticidas a concentraciones inferiores a aquellas que previsiblemente podrían interferir en la interpretación de ensayos celulares realizados con los extractos vegetales analizados.

No obstante, debe considerarse que esta evaluación constituye una aproximación conservadora basada en datos de citotoxicidad publicados para diferentes modelos celulares y condiciones experimentales. Por tanto, el FST debe interpretarse como una herramienta orientativa para valorar la adecuación del método al uso previsto, más que como un indicador absoluto del riesgo biológico asociado a cada pesticida.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que el método desarrollado presenta una sensibilidad compatible con la aplicación prevista en estudios *in vitro*, proporcionando un margen de seguridad suficiente para minimizar la probabilidad de que residuos de pesticidas presentes a nivel de trazas condicionen la interpretación de los ensayos biológicos.

5. DISCUSIÓN

La cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem fue una técnica apropiada para conseguir la separación de la mayor parte de los pesticidas incluidos en el estudio y regular sus tiempos de retención. Las condiciones finales descritas en la metodología se eligieron tras la realización de numerosas pruebas y ensayos hasta determinar las óptimas para la correcta identificación de los picos.

La optimización del método puso de manifiesto la complejidad del análisis simultáneo de múltiples analitos en matrices complejas. Este comportamiento es habitual en el desarrollo de métodos multirresiduo mediante LC-MS/MS, donde pequeñas diferencias en la instrumentación o en las condiciones cromatográficas pueden requerir ajustes específicos para mantener la sensibilidad y selectividad del método, tal y como han descrito Lopes et al.^[36]. Además, evidenció la necesidad de adaptar los métodos a la instrumentación disponible en cada laboratorio y de realizar ajustes metodológicos para su implementación en nuevos entornos de investigación.

A pesar de que el estudio se planteó inicialmente sobre 203 pesticidas, la validación efectiva solo se consiguió para 168 compuestos, pues 35 analitos presentaron una señal demasiado baja para las condiciones instrumentales empleadas. La exclusión de 35 analitos no debe interpretarse como un fracaso de la metodología, sino como una limitación inherente al desarrollo de métodos multirresiduo universales, en los que la optimización simultánea para un elevado número de compuestos implica necesariamente un compromiso entre cobertura analítica y rendimiento individual de cada analito. Esta limitación es consecuencia de la elevada diversidad estructural y fisicoquímica de los pesticidas, que condiciona su eficiencia de ionización y fragmentación, dificultando que todos los compuestos respondan de forma óptima bajo unas mismas condiciones instrumentales, como describen Stachniuk y Fornal^[37].

Analíticamente, la linealidad, precisión y exactitud obtenidas respaldan la validez del método para los compuestos finalmente incluidos. La mayoría de los pesticidas cumplieron los criterios establecidos por la guía SANTE, lo que indica que el método proporciona una respuesta proporcional a la concentración, que es reproducible y suficientemente exacta. La menor estabilidad observada tras el almacenamiento prolongado concuerda con lo descrito por Avramides^[38], quien demostró que determinados pesticidas pueden sufrir procesos de degradación incluso durante el almacenamiento de patrones y disoluciones estándar, lo que justifica la necesidad de emplear patrones recientes o verificar periódicamente su estabilidad para evitar pérdidas de señal.

Los parámetros de validación obtenidos son comparables a los publicados para métodos LC-MS/MS desarrollados en frutas, hortalizas y otras matrices vegetales, donde habitualmente se alcanzan coeficientes de determinación superiores a 0,99 y recuperaciones comprendidas entre el 70 y el 120 % ^[39,40]. Pero lo cierto es que la mayoría de las publicaciones se centran en la materia prima vegetal como tal, siendo menos frecuentes los estudios dirigidos específicamente a los extractos vegetales destinados a ensayos celulares. En este sentido, este trabajo adapta un enfoque analítico ya conocido a demostrar la necesidad de comprobar que los extractos no contienen contaminantes capaces de comprometer la interpretación de sus efectos biológicos.

La aplicación del método permitió evaluar la posible presencia de residuos de pesticidas tanto en el extracto de paja de arroz como en el extracto comercial de granada Viqua. La presencia de señales en ambos casos indica que incluso extractos con distinto origen y grado de control pueden contener trazas de contaminantes. No obstante, la interpretación debe ser prudente: los compuestos detectados se situaron por debajo del LOD, por lo que no puede afirmarse una cuantificación fiable ni una carga contaminante elevada.

Debido a las diferencias en el origen y las condiciones de producción de ambas matrices, era razonable plantear expectativas distintas respecto a la posible presencia de contaminantes, siendo el extracto de paja de arroz el que presentara una mayor probabilidad de contener residuos por su origen agrícola. En Viqua, la detección de trazas evidencia que los procesos de producción y purificación en productos comerciales no garantizan por sí solos la ausencia absoluta de residuos. Esto refuerza el deber de incorporar controles analíticos previos al uso de estos extractos en ensayos celulares.

La incorporación del Factor de Seguridad Toxicológica (FST) al trabajo conecta la validación analítica con el uso real del método en ensayos celulares. El FST cuestiona si la sensibilidad alcanzada es suficiente para descartar que los pesticidas presentes a nivel de trazas puedan interferir en los ensayos in vitro. Comparando la concentración máxima potencial de cada pesticida en el medio celular con las concentraciones citotóxicas descritas en la literatura, el FST es capaz de transformar un parámetro analítico en un criterio de seguridad experimental.

Los resultados del FST demuestran que, para la mayoría de los pesticidas, las concentraciones potencialmente presentes durante el tratamiento celular serían inferiores a las asociadas con efectos citotóxicos. Por tanto, el método da un margen razonable para minimizar el riesgo de atribuir erróneamente el extracto vegetal una respuesta biológica causada por residuos de pesticidas. De todas formas, los compuestos con menor

margen de seguridad deberían considerarse prioritarios en futuros controles, ya que pequeñas variaciones en su concentración podrían tener mayor relevancia biológica. Por ello, para estos casos se debería optimizar el método para reducir sus límites de detección y cuantificación. Esto se podría conseguir mejorando el proceso de preparación de la muestra, consiguiendo una mayor concentración del extracto o limpiando de forma más eficaz la matriz vegetal.

Para implementar el método en el laboratorio, este se podría emplear como control de calidad previo al uso de extractos vegetales en los ensayos celulares. Su aplicación permitiría la selección de lotes de extractos más seguros, procedentes de diferentes proveedores o de distintos procesos de extracción para usarlos posteriormente en los ensayos de bioactividad. Gracias a la automatización del tratamiento de los datos mediante Python, su uso rutinario es más fácil, reduciendo el tiempo de análisis y disminuyendo la variabilidad asociada al procesamiento manual de la información.

Las principales limitaciones del estudio son el número reducido de matrices analizadas y la imposibilidad de validar los 203 pesticidas inicialmente planteados. Es más, el FST se basa en datos bibliográficos de citotoxicidad obtenidos en modelos celulares y condiciones experimentales heterogéneas. Es por ello por lo que esta medida solo debe interpretarse como una herramienta orientativa y no como una medida absoluta del riesgo.

Independientemente de las diferencias observadas en el contenido de pesticidas entre ambas matrices, cabe resaltar que la detección de residuos de pesticidas no permite establecer de forma directa una relación con la actividad biológica de los extractos. Este trabajo se ha centrado en su identificación y cuantificación, proporcionando información sobre la calidad química de estas matrices, lo cual no implica que su presencia o ausencia suponga una alteración de sus propiedades bioactivas, aunque es una posibilidad que se plantea. La influencia real de estos contaminantes sobre los efectos terapéuticos, antioxidantes, antiinflamatorios o citotóxicos atribuidos a los extractos, así como sus posibles efectos combinados, requiere estudios específicos que evalúen directamente la respuesta biológica.

De este modo, el método analítico desarrollado constituye una herramienta fundamental para futuros estudios de calidad, seguridad y caracterización funcional de extractos vegetales, aportando datos esenciales para interpretar correctamente los resultados biológicos obtenidos en investigaciones posteriores.

6. CONCLUSIÓN

- ✓ Se desarrolló y validó un método mediante UHPLC-MS/MS para la determinación simultánea de 168 pesticidas en extractos vegetales, obteniéndose parámetros de linealidad, precisión, exactitud, estabilidad y sensibilidad acordes con los criterios establecidos por la guía SANTE/11312/2021.
- ✓ La automatización del tratamiento de datos mediante Python permitió agilizar el cálculo de los parámetros de validación y estandarizar el procesamiento de los resultados analíticos.
- ✓ La aplicación del método a extractos vegetales reales permitió detectar residuos de pesticidas a nivel de trazas, demostrando su aplicabilidad en este tipo de matrices.
- ✓ La comparación entre las concentraciones detectadas y los valores de citotoxicidad descritos en la literatura indicó que, en las condiciones evaluadas, las concentraciones estimadas de los pesticidas fueron inferiores a las asociadas con efectos citotóxicos.
- ✓ La incorporación del Factor de Seguridad Toxicológica (FST) permitió complementar la validación analítica mediante una evaluación orientada al uso previsto del método en estudios *in vitro*.
- ✓ En conjunto, los resultados obtenidos indican que el método desarrollado constituye una alternativa adecuada para el análisis de residuos de pesticidas en extractos vegetales destinados a estudios biológicos.

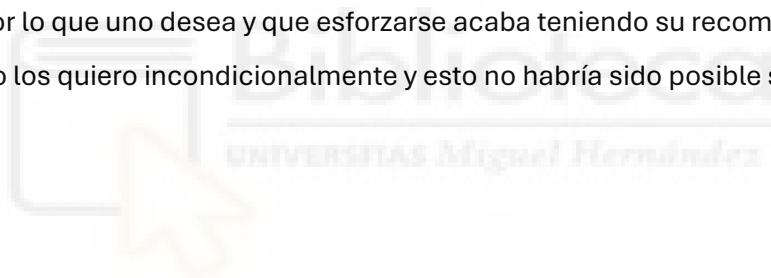
Como futuras líneas de investigación, sería de interés evaluar experimentalmente si los residuos de pesticidas presentes en extractos vegetales son capaces de modificar la respuesta biológica observada en modelos empleados para estudiar su potencial terapéutico. Para ello, podrían compararse los efectos biológicos de extractos antes y después de la eliminación de los residuos de pesticidas mediante procedimientos de purificación adecuados. Estos estudios podrían realizarse inicialmente en modelos celulares *in vitro* y, posteriormente, ampliarse a modelos *in vivo*, permitiendo confirmar si los residuos detectados ejercen alguna influencia sobre la actividad biológica de los extractos y validar experimentalmente la aproximación toxicológica propuesta en este trabajo.

7. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, gracias a mis tutores, los Dres. Vicente Micol Molina y María Herranz López, por brindarme la oportunidad de hacer este trabajo en su equipo de investigación. Especialmente, gracias a mi tutora María Losada Echeberría, porque sin sus conocimientos y ayuda este proyecto habría sido posible. Para mí, se ha convertido en un ejemplo a seguir de esfuerzo y sé que sus consejos me serán muy útiles en este nuevo camino que voy a comenzar.

Por otro lado, gracias a mis amigos de la uni. Sin ellos, estos años no habrían pasado tan rápido. Me quedo con los recuerdos que hemos ido creando juntos, tanto en los días de clase, en nuestros perezosos descansos sin ver la luz del sol, como en los días más especiales. También quiero agradecer el apoyo de mis amigas, que, aunque todas prácticamente vivan fuera de la ciudad, han sido parte del proceso y me han animado siempre que lo he necesitado.

Pero, sobre todo, gracias a mi familia: a mis primos, a mis tíos, a mi abuela y, por supuesto, a mis padres. Sé que estos últimos años han sido bastante duros, y aún parece que la vida no se cansa de ponernos a prueba. A pesar de todo, me han enseñado que nunca hay que rendirse, que hay que luchar por lo que uno desea y que esforzarse acaba teniendo su recompensa. No lo digo lo suficiente, pero los quiero incondicionalmente y esto no habría sido posible sin ellos.



8. BIBLIOGRAFÍA

1. Aktar, W. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2. <https://doi.org/doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
2. Nguyen, T. T., Rosello, C., Bélanger, R., & Ratti, C. (2020). Fate of Residual Pesticides in Fruit and Vegetable Waste (FVW) Processing. *Foods*, 9(10), 1468. <https://doi.org/10.3390/foods9101468>
3. *Understanding the context | Pest and Pesticide Management | Food and Agriculture Organization of the United Nations | IPM and Pesticide Risk Reduction | Food and Agriculture Organization of the United Nations*. (s. f.). Recuperado 27 de mayo de 2026, de <https://www.fao.org/pest-and-pesticide-management/about/understanding-the-context/en/>
4. *NTP 143: Pesticidas: clasificación y riesgos principales - PDF - Portal INSST - INSST*. (s. f.). Portal INSST. Recuperado 27 de mayo de 2026, de <https://www.insst.es/documentacion/coleccion-tecnicas/ntp-notas-tecnicas-de-prevencion/4-serie-ntp-numeros-121-a-155-ano-1985/ntp-143-pesticidas-clasificacion-y-riesgos-principales>
5. Insecticide Resistance Action Committee. (2024). Clasificación del modo de acción de pesticidas y acaricidas. *IRAC España, Versión 6.2*.
6. Richardson, J. R., Fitsanakis, V., Westerink, R., & Kanthasamy, A. G. (2019). Neurotoxicity of Pesticides. *Acta neuropathologica*, 138(3), 343-362. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02033-9>
7. Jitäreanu, A., Trifan, A., Vieriu, M., Caba, I.-C., Mârțu, I., & Agoroaei, L. (2023). Current Trends in Toxicity Assessment of Herbal Medicines: A Narrative Review. *Processes*, 11(1), 83. <https://doi.org/10.3390/pr11010083>
8. Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268(2), 157-177. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.025>
9. *Pesticides | EFSA*. (2026, febrero 24). <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/pesticides>
10. Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on Maximum Residue Levels of Pesticides in or on Food and Feed of Plant and Animal Origin and Amending Council Directive 91/414/EEC Text with EEA Relevance., 070 OJ L (2005). <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/396/oj>
11. (S. f.). En *European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM)*. (2019). 2.8.13. *Pesticide residues*. En *European Pharmacopoeia 10.0*. Recuperado https://ehpm.org/wp-content/uploads/2022/04/QG22_2-8-13_Pesticide_residues_ep10_2.pdf
12. The 2013 European Union report on pesticide residues in food. (2015). *EFSA Journal*, 13(3), 4038. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4038>
13. *Banned pesticides still in use in the EU*. (2023, enero 11). PAN Europe. <https://www.pan-europe.info/resources/reports/2023/01/banned-pesticides-still-use-eu>
14. *European Commission*. (S. F.). *EU Pesticides Database*. Directorate-General for Health and Food Safety. (s. f.). Recuperado https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en

15. Proestos, C. (2020). The Benefits of Plant Extracts for Human Health. *Foods*, 9(11), 1653. <https://doi.org/10.3390/foods9111653>
16. Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., & Hens, L. (2016). Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Frontiers in Public Health*, 4, 148. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148>
17. Valera-Tarifa, N. M., Santiago-Valverde, R., Hernández-Torres, E., Martínez-Vidal, J. L., & Garrido-Frenich, A. (2020). Development and full validation of a multiresidue method for the analysis of a wide range of pesticides in processed fruit by UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 315, 126304. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126304>
18. Kim, Y.-K., Baek, E. J., Na, T. W., Sim, K. S., Kim, H., & Kim, H. J. (2024). LC-MS/MS and GC-MS/MS Cross-Checking Analysis Method for 426 Pesticide Residues in Agricultural Products: A Method Validation and Measurement of Uncertainty. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(41), 22814-22821. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c01992>
19. Chow, W., Leung, D., & Wang, J. (2022). A Complementary, Quantitative, and Confirmatory Method to UHPLC/ESI Q-Orbitrap Screening Based on UPHLC/ESI-MS/MS for Analysis of 416 Pesticides in Fruits and Vegetables. *Journal of AOAC International*, 105(2), 413-432. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsab116>
20. Snyder, L. R., & Kirkland, J. J. (1979). *Introduction to modern liquid chromatography* (2d ed). Wiley.
21. Nováková, L., Svoboda, P., & Pavlík, J. (2017). Chapter 29—Ultra-high performance liquid chromatography. En S. Fanali, P. R. Haddad, C. F. Poole, & M.-L. Riekkola (Eds.), *Liquid Chromatography (Second Edition)* (pp. 719-769). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00029-4>
22. Skoog, D.A., Holler, F.J. and Crouch, S.R. (2017) *Principles of Instrumental Analysis* (7.^a ed.). Cengage Learning, Sección 20B-5. (s. f.).
23. Kebarle, P., & Verkerk, U. H. (2009). Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrometry Reviews*, 28(6), 898-917. <https://doi.org/10.1002/mas.20247>
24. Skoog, D.A., Holler, F.J. and Crouch, S.R. (2017) *Principles of Instrumental Analysis* (7.^a ed.). Cengage Learning, Sección 20C-5. (s. f.).
25. Lange, V., Picotti, P., Domon, B., & Aebersold, R. (2008). Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: A tutorial. *Molecular Systems Biology*, 4(1), MSB200861. <https://doi.org/10.1038/msb.2008.61>
26. *Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in Food and Feed—SANTE 11312/2021 v2026*. (s. f.).
27. Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., & Chavez-Eng, C. M. (2003). Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75(13), 3019-3030. <https://doi.org/10.1021/ac020361s>
28. Annesley, T. M. (2003). Ion Suppression in Mass Spectrometry (Abstract). *Clinical Chemistry*, 49(7), 1041-1044. <https://doi.org/10.1373/49.7.1041>

29. Chambers, E., Wagrowski-Diehl, D. M., Lu, Z., & Mazzeo, J. R. (2007). Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 852(1-2), 22-34. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.12.030>
30. LC Multiresidue Pesticide Standards Kit. (s. f.). Recuperado <https://www.restek.com/global/en/p/31971>
31. Ikeda, Y., Nasu, M., Bruxer, J., Díaz-Puertas, R., Martínez-Godfrey, J., Bulbaničková, D., Herranz-López, M., Micol, V., & Álvarez-Martínez, F. J. (2025). Photoprotective, Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Aged Punica granatum Extract: In Vitro and In Vivo Insights. *Food Science & Nutrition*, 13(8), e70631. <https://doi.org/10.1002/fsn3.70631>
32. ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures—Scientific guideline | European Medicines Agency (EMA). (1994, noviembre 1). <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>
33. Magnusson, B., & Örnemark, U. (2014). *Eurachem guide: The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics (2nd ed.)*. <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>
34. Huang, R., Xia, M., Sakamuru, S., Zhao, J., Shahane, S. A., Attene-Ramos, M., Zhao, T., Austin, C. P., & Simeonov, A. (2016). Modelling the Tox21 10 K chemical profiles for in vivo toxicity prediction and mechanism characterization. *Nature Communications*, 7(1), 10425. <https://doi.org/10.1038/ncomms10425>
35. ToxCast Chemical Landscape: Paving the Road to 21st Century Toxicology | Chemical Research in Toxicology. (s. f.). Recuperado 23 de junio de 2026, de <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrestox.6b00135>
36. Lopes, R. P., Reyes, R. C., Romero-González, R., Vidal, J. L. M., & Frenich, A. G. (2012). Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 895-896, 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.03.011>
37. Stachniuk, A., & Fornal, E. (2016). Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food. *Food Analytical Methods*, 9(6), 1654-1665. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0342-0>
38. Avramides, E. J. (2005). Long-term stability of pure standards and stock standard solutions for the determination of pesticide residues using gas chromatography. *Journal of Chromatography. A*, 1080(2), 166-176. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.04.094>
39. Botitsi, H., Economou, A., & Tsiipi, D. (2007). Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in processed fruits and vegetables using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(6), 1685-1695. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1452-3>

40. Sivaperumal, P., Anand, P., & Riddhi, L. (2015). Rapid determination of pesticide residues in fruits and vegetables, using ultra-high-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Food Chemistry*, 168, 356-365. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.072>

9. ANEXOS

1. Base de datos Excel obtenida de *EURL Data Pool* con transiciones MRM: recoge la masa/carga de los iones parentales y sus fragmentos.
<https://docs.google.com/spreadsheets/d/19KLyMV8kukmqpFx1Rz1QWG5dSdGfFCY2/edit?usp=sharing&ouid=111481315993613512691&rtpof=true&sd=true>
2. Archivos para cargar en el Google Colab que contiene: datos de calibración, su replicado, datos de 24 horas y de un día de estabilidad.
https://drive.google.com/drive/folders/1TPJ_ub9H8Qwm02MnPqPzSKvdGpfh6NUe?usp=drive_link
3. Archivo generado en Google Colab con los resultados de la validación y cuantificación.
<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1uxqfRPE5Vh34GKk2710NS7dKOYxZWx2w/edit?usp=sharing&ouid=111481315993613512691&rtpof=true&sd=true>
4. Código desarrollado en Google Colab para el cálculo de los parámetros de validación.
https://colab.research.google.com/drive/1fv_mBS6lnfkqwnVpFhxzl8RTS1iWtUge?usp=sharing
5. Tabla con el cálculo del Factor de Seguridad Toxicológica (FST) para los pesticidas validados.
<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1SKCjmsGHqKZAVN-8mJrQYs97m9WvAX6k/edit?usp=sharing&ouid=111481315993613512691&rtpof=true&sd=true>