

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Evaluación de residuos de plaguicidas, micotoxinas y contaminantes de procesamiento como descriptores claves de inocuidad química en la poscosecha de la cadena de producción cafetera de la región del Tolima empleando estrategias analíticas basadas en marcado de isótopos estables (SIL)**

**Julio César España Amórtegui**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá D.C., Colombia  
2024



**Evaluación de residuos de plaguicidas, micotoxinas y contaminantes de procesamiento como descriptores claves de inocuidad química en la poscosecha de la cadena de producción cafetera de la región del Tolima empleando estrategias analíticas basadas en marcado de isótopos estables (SIL)**

**Julio César España Amórtegui**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Doctor en Ciencias - Química**

Director (a):

Ph.D. Jairo Arturo Guerrero Dallos

Línea de Investigación:

Química agroalimentaria y ambiental

Grupo de Investigación:

Residualidad y destino ambiental de plaguicidas en sistemas agrícolas

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá D.C., Colombia

2024



*A mis padres y a toda mi familia.*

## Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

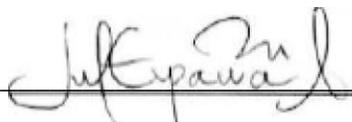
He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Firma: \_\_\_\_\_



Nombre: Julio César España Amórtegui

Fecha 30/01/2024

## Agradecimientos

La presente investigación fue parcialmente financiada por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Tecnología (MinCiencias) bajo el programa “Becas de Excelencia Doctoral del Bicentenario”. Un agradecimiento especial a la Agencia Sueca de Alimentos por organizar una pasantía y proporcionar los equipos e instrumentos utilizados en este trabajo junto con la Agencia Internacional de Energía Atómica (OIEA) que apoya la infraestructura en el proyecto COL 5025 y el proyecto de investigación coordinada D52039/ 22177 en Colombia.

Agradecimientos especiales a Susanne Ekroth y Tuija Philström por su valiosa ayuda en la conceptualización y supervisión varios aspectos del trabajo, y a Heidi Pekar por la adquisición de recursos y autorizaciones para mi estancia en de la Unidad de Toxinas y Contaminantes. A Matilda Näslund y Aune Marie, de la Unidad de Pesticidas y Contaminantes Orgánicos Persistentes por suministrarme acceso a los HAPs. En general a los integrantes del grupo: Aida, Johan, Ana María, Netten, Tobias, Paolo y Leonore. A Martin, Anders, Harold y Shyamraj por ser tan amables y a los de la unidad de antibióticos y demás personal del departamento de Química de la Agencia Sueca de Alimentos.

En especial a Jairo Arturo Guerrero Dallos por su ayuda como guía en la conceptualización, investigación, administración del proyecto, obtención de financiamiento, supervisión, revisión y edición, y en lo personal, a su mentoría en diferentes aspectos profesionales, paciencia y su valiosa amistad. Asimismo, serán pocos los agradecimientos a todos los integrantes del LARP, a Yury, Gaby, Iván, Elkin, Vale, Cristian y Sergio.

A Luis Fernando Olaya, Jorge Díaz, Carlos Agudelo y a la profesora María José Martínez por suministrar muestras de café provenientes del departamento del Tolima y España.

A Jenny por su iniciativa y amor, y a mis amigos de siempre que llevaré en el alma.

A mis padres, y

A toda mi familia.

*A todos, gracias totales (G. C.)*



## Resumen

### **Evaluación de residuos de plaguicidas, micotoxinas y contaminantes de procesamiento como descriptores claves de inocuidad química en la poscosecha de la cadena de producción cafetera de la región del Tolima empleando estrategias analíticas basadas en marcado de isótopos estables (SIL)**

Se presenta el desarrollo y validación de un procedimiento simple, integral y amigable con el medio ambiente para determinar residuos de plaguicidas, contaminantes naturales y de procesamiento en el café tostado por LC-HRMS, e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) vía GC-MS/MS. Para la primera técnica se extraen plaguicidas y micotoxinas con acetato de etilo, con una partición simultánea de acrilamida (AA) en fase acuosa en la misma porción analítica. Una microextracción en fase sólida dispersiva 'en tubo' (dSPME) retiene la AA para inyectarla de forma independiente de los compuestos de la fase orgánica. A través de novedoso método de cromatografía líquida de espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS) se cuantificaron 186 compuestos a 10 µg/kg, 226 a 5 µg/kg y la AA a 200 µg/kg, para un total de 414 moléculas con recuperación (70%-120%) y precisiones aceptables (RSD<20%). Se confirmó la presencia de clorpirifos, AA y ocratoxina A (OTA) en muestras de diferente origen por debajo del límite de cuantificación. No hubo evidencia de enmascaramiento de OTA durante el almacenamiento del café; sin embargo, se evidenció condensación con glucosa durante experimentos de procesamiento térmico con sacarosa mediante el uso de marcado con isótopos estables (SIL). No se encontraron conjugados en muestras de café tostado ni torrefacto. Entre las alternativas revisadas para determinar los HAPs, una transesterificación precedió la cuantificación que fue validada para un grupo de HAPs que incluyó los 4 indicadores en la regulación vigente. Algunos hallazgos en muestras comerciales fueron cuantificados por GC-MS/MS y confirmados por LC-HRMS.

**Palabras clave:** Ocratoxin A; Acrilamida; plaguicidas; hidrocarburos aromáticos policíclicos, marcado de isótopos estables; validación; ambientalmente amigable.

## Abstract

### **Evaluation of pesticide residues, mycotoxins, and processing contaminants as key descriptors of food safety in the post-harvest of the coffee production chain in the Tolima region using analytical strategies based on stable isotope labeling (SIL)**

The development and validation of a simple, comprehensive, and environmentally friendly procedure is presented to determine pesticide residues, natural and processing contaminants in roasted coffee by LC-HRMS, and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) via GC-MS/MS. For the first technique, pesticides and mycotoxins are extracted with ethyl acetate, along a simultaneous partition of acrylamide (AA) in the aqueous phase in the same analytical portion. An 'in-tube' dispersive solid phase microextraction (dSPME) retains the AA for injection independently of the organic phase compounds. A novel liquid chromatography high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) method allows the quantification of 186 compounds at 10 µg/kg, 226 at 5 µg/kg and AA at 200 µg/kg for a total of 414 molecules with recovery (70%-120%) and acceptable precisions (RSD<20%). The presence of chlorpyrifos, AA and OTA was confirmed in samples of different origins below the limit of quantification. There was no evidence of OTA masking during coffee storage; however, condensation with glucose molecules was evident during thermal processing experiments with sucrose using stable isotope labeling (SIL). No conjugates were found in roasted or *torrefacto* coffee samples. Among the tested alternatives to determine PAHs, a transesterification process allowed a determination validated for a group that included selected indicative 4 PAHs in the current regulation. Some findings in commercial samples were quantified by GC-MS/MS and confirmed by LC-HRMS.

**Keywords:** Ochratoxin A; acrylamide; pesticides; polycyclic aromatic hydrocarbons; stable isotope labelling; validation; eco-friendly.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>X</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XV</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Capítulo 1: Métodos</b> .....	<b>17</b>
1.1 Materiales .....	17
1.1.1 Productos químicos, estándares y consumibles.....	17
1.1.2 Muestras.....	19
1.2 Condiciones instrumentales .....	20
1.2.1 LC-HRMS .....	20
1.2.2 GC-MS/MS .....	21
1.1 Validación .....	22
<b>2. Capítulo 2: Ochratoxin A y formas modificadas</b> .....	<b>23</b>
2.1 Condiciones preliminares para LC-HRMS .....	23
2.2 Evaluación enfocada en la OTA .....	24
2.3 Modificaciones potenciales de la OTA durante el almacenamiento .....	27
2.4 Método orientado para la determinación de OTA en café verde y tostado.....	30
2.5 Enmascaramiento de la OTA durante el procesamiento.....	35
<b>3. Capítulo 3: Integración de análisis clave y ampliación del alcance</b> .....	<b>39</b>
3.1 Integración de métodos individuales .....	41
3.1 Ampliación del alcance.....	45
<b>4. Capítulo 4: Contaminantes potenciales en el procesamiento a alta temperatura</b> .....	<b>54</b>
4.1 Preliminares para el desarrollo de un método .....	54
4.2 Explorando una alternativa por LC-APCI-HRMS .....	60
4.1 Determinación de HAPs por GC-MS/MS .....	65
<b>5. Conclusiones y recomendaciones</b> .....	<b>71</b>
5.1 Conclusiones.....	71
5.2 Recomendaciones.....	72



## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1-1:</b> Mapa basado en información bibliográfica empleando un análisis de co-ocurrencia de términos clave.....	11
<b>Figura 1-2:</b> Estrategias basadas en el uso de SIL en metabolómica para asistir a las estrategias de determinación de compuestos relacionados. Tomado de [89] .....	15
<b>Figura 2-1:</b> Mapa de calor que muestra la correlación de los compuestos detectados y una muestra de café tostado. ....	33
<b>Figura 2-2:</b> Café contaminado artificialmente con <sup>13</sup> C-OTA nativo, marcado y sacarosa agregada, luego sometido a procesamiento térmico a 175 °C por 5 min. ....	37
<b>Figura 3-1:</b> Esquema de flujo de trabajo para la determinación de AA y OTA mediante microextracción sólida dispersiva 'en tubo' (dSPME).....	40
<b>Figura 3-2:</b> Representación esquemática de los modos de adquisición en LC-HRMS en Full Scan (MS1) y fragmentación (MS2) de segmentos preseleccionados. ....	47
<b>Figura 3-3:</b> Visualización resumida de los resultados de la validación a diferentes niveles (R1: 5 µg/kg, R2: 10 µg/kg y R3: 20 µg/kg) en café tostado. ....	50
<b>Figura 4-1:</b> Componentes endógenos en el extracto de AcOEt con el método dSPME-GC empleando GCB.....	57
<b>Figura 4-2:</b> Modelo de Superficie de respuesta (RSM) para interfaz LC-APCI-HRMS. .	62
<b>Figura 4-3:</b> Efecto matriz en PAHs por LC-APCI-HRMS, curvas de calibración en solvente (■) y en matriz (□).....	64
<b>Figura 4-4:</b> Enfoque mini-método para la determinación de HAPs en café tostado por extracción con AcOEt, transesterificación y análisis por GC-MS/MS. ....	65
<b>Figura 4-5:</b> Diagramas de cajas del % recuperación (10, 20, 40 y 80 µg/kg) para los grupos II y III en café tostado por extracción con AcOEt, transesterificación y análisis por GC-MS/MS.....	67



## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 2-1:</b> Consolidado del conteo de compuestos con supresión/aumento respecto a la mezcla de referencia (Mezcla 4, MeOH/H <sub>2</sub> O 1:1) .....	30
<b>Tabla 2-2:</b> Ejemplos de compuestos endógenos de los extractos de café con anotación tentativa.....	31
<b>Tabla 3-1:</b> Muestras comerciales de café (marcas no divulgadas) de diferente origen y características que fueron utilizadas en el estudio de aplicabilidad. ....	52
<b>Tabla 4-1:</b> Ensayos de recuperación preliminares para 12 HAPs a bajas concentraciones con el método dSPME-GC empleando alúmina en modo dMRM (GC-MS/MS). ....	59
<b>Tabla 4-3:</b> Exactitud y precisión del método de transesterificación por GC-MS/MS. ....	68
<b>Tabla 4-3:</b> Recuperación y proporción de transiciones del control de calidad incluido en el análisis del lote de muestras. ....	69

**Nota:** Los nombres de los compuestos (nomenclatura química universal consensuada, IUPAC<sup>1</sup>) se indica en inglés, pero sin cursiva.

---

<sup>1</sup> International Union of Pure and Applied Chemistry

# Introducción

El café es una de las bebidas más populares a nivel global. El café tipo exportación que es cultivado en el territorio nacional es conocido como “Café de Colombia”, [1, 2] y se convirtió en marca insignia de la más alta calidad en todo el mundo. No obstante, los riesgos a la inocuidad tienen un impacto directo en su calidad y, por ende, en la cadena productiva. A través de los años, el país se ha abocado al desarrollo de un proceso de producción robusto, clave en una economía andina típicamente agrícola, para así lograr tal reconocimiento a nivel internacional. Ya sea a través de mecanismos de registro bajo la figura de marca, indicación geográfica o denominación de origen [3], la Fundación para la Certificación del Café de Colombia (CAFECERT) busca constantemente protección comercial que relacione la calidad particular de cada café con su valor en el mercado. Específicamente, la producción de cafetos cultivados en la región del departamento del Tolima (*coffea arabica*) cuenta con un enorme potencial y se destaca por un perfil de taza suave con notas frutales. La agroindustria tolimense del café se ha distinguido como triple ganadora del Concurso Nacional de Calidad de Café Colombia por sus atributos de balance, cuerpo y acidez, donde en la subasta internacional del año 2018 logró los 20 USD por libra [4]. Además, el café en este departamento es fuente de trabajo para 38 municipios cafeteros, que registran cerca de 117.000 hectáreas sembradas en café en más de 71.000 fincas pertenecientes a 61.000 caficultores que representan el 11% de los productores del país según el último informe de los comités departamentales de la Federación Nacional de Cafeteros [5]. El 79% de su parque cafetero se ha tecnificado joven y a noviembre de 2018 se renovaron 9.327 hectáreas, lo que significa un muy buen potencial productivo para el departamento [4].

*Coffea arabica* (café arábica), *C. canephora var. robusta* (café robusta), *C. liberica* (café liberica) y *C. liberica var. dewevrei* (café excelso) son algunos ejemplos de especies de gran importancia en el mercado del café. Dado que esta bebida de uso diario cuenta con un sabor universalmente apreciado, los controles que garantizan la confianza en este

producto deben incluir posibles contaminantes provenientes de la poscosecha y además del procesamiento. Las micotoxinas son un grupo diverso de productos metabólicos secundarios altamente tóxicos de varias especies de hongos que podrían considerarse ubicuos en el medio ambiente. Una vez que las especies productoras de micotoxinas infectan el campo, pueden terminar en los granos maduros [6], luego desarrollarse durante las etapas de procesamiento y sus productos pueden incluso resistir duras condiciones como el tostado del café [7]. En este sentido, los pequeños operadores deben prestar atención a los programas destinados a garantizar el cumplimiento de buenas prácticas para evitar la formación de mohos [8]. También resulta importante abordar la infestación durante el almacenamiento, ya que puede generar riesgos potenciales fuera del alcance de los productores de café, poniendo en peligro una industria basada en la calidad suprema. De hecho, las recomendaciones dirigidas a mitigar estos riesgos pueden enfrentar desafíos durante la extensión de los tiempos de almacenamiento, y, además, en condiciones inusuales como la pandemia, la crisis comercial global o los cambios súbitos en la dinámica acelerada del mercado, que pueden llegar a obstaculizar gravemente las exportaciones de café [9, 10]. La ochratoxin A (OTA) es la variante más tóxica de las ocratoxinas y representa un grave riesgo para la salud animal y humana [11]. Aunque la forma más efectiva de prevenir la contaminación por OTA es asegurar un contenido de humedad <12,5% [12, 13], en algunas regiones el café se vende húmedo (>50%) principalmente debido a la falta de infraestructura (secadores eléctricos vs. secado al sol). Esta situación se ha estudiado recientemente, no obstante, no se presentaron diferencias significativas en la carga de moho al mantener el café húmedo (35%-45%) después de 96 h hasta el secado en contra de un valor estricto de humedad [14]. Sin embargo, mantener la humedad en los sacos de café durante el transporte puede terminar en el detrimento de la calidad, que puede darse no sólo por los frecuentes retrasos en los caminos rudimentarios en el recorrido que cruza la montaña, sino a largo plazo, durante el almacenamiento y transporte al extranjero. Dado que no se deben comercializar alimentos que contengan un contaminante en cantidades inaceptables [15], el Reglamento 1881/2006 de la Comisión estableció niveles máximos de contaminantes, incluidas micotoxinas, y las enmiendas en vigencia sobre algunos contaminantes críticos [16–18]. Posteriormente, las regulaciones CE 105/2010 [19] y CE 594/2012 [20] incluyeron un nivel máximo de OTA en productos que no habían sido considerados en la normativa anterior. Esta regulación se actualizó recientemente para reducir el nivel a 3 µg/kg en el café tostado [21]. Los métodos basados en extracción y limpieza por columnas de inmunoafinidad para

analizar OTA en café son bastante convencionales en laboratorios de rutina, desde hace más de 20 años solo existe una actualización de la norma europea bajo el mismo esquema de trabajo [22, 23]. Las políticas de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) cubren todos los asuntos relacionados con la seguridad de los alimentos y piensos en la UE y han indicado que las formas modificadas de micotoxinas pueden añadir cantidades sustanciales a los niveles detectados en el producto, ya que podrían contribuir a la toxicidad general. Se está estudiando la aparición de algunas formas modificadas de toxinas desde que se estableció como criterio fundamental comprender la exposición de manera integral [24]. Sin embargo, las posibles formas modificadas de OTA no se han considerado en la legislación hasta el momento [25], por lo que es imperativo profundizar más para comprender el potencial de cualquier forma transformada que surja de una contaminación preexistente durante el almacenamiento a largo plazo. Es por eso que, buscar las modificaciones que podría sufrir la OTA es de vital importancia ya que, si se encuentra, tiene el potencial de liberar la toxina de la matriz o terminar hidrolizada a partir de una estructura que contenga la micotoxina activa. Esta situación daría lugar a valores superiores a los límites, incluso si el producto está etiquetado como conforme mediante métodos rutinarios bien establecidos. Además, existen tendencias del mercado que abogan por la diferenciación de las características organolépticas en taza y se están promoviendo cambios en los protocolos estandarizados a medida que los consumidores exigen innovación y novedad. Precisamente esto fue lo que popularizó el comercio de la cereza seca que mantiene la piel exterior, es decir, sin ningún tipo de descascarado (natural), además de un proceso que no retira las capas de cáscara y 'pulpa' de endocarpio de los granos, ósea sin retirar el mucílago (*honey*). Estas variedades artesanales suelen encontrarse en mercados de cafés especiales, donde los comerciantes pueden obtener beneficios adicionales promocionando los matices exóticos derivados del café parcialmente intacto. Sin embargo, las desviaciones del estándar de café para exportación (café lavado) podrían mantener la humedad dentro del grano por más tiempo. Por lo tanto, los peligros potenciales derivados de las modificaciones de la OTA en condiciones de almacenamiento a largo plazo también deben abordarse en estos tipos alternativos de café "verde" o crudo, así como durante los tratamientos térmicos que tienen lugar en reconocidas fábricas industriales de café. Es cierto que la mejora facilita el acceso de los productores al mercado del café de alto valor y a menudo se asocia con mayores ingresos agrícolas, ya que los consumidores suelen pagar un sobreprecio a cambio de mayor calidad [9]. Un ejemplo de ello es que ahora los agricultores también poseen tostadoras de

pequeña escala, lo que les permite aprovechar al máximo su producción. Sin embargo, durante el proceso térmico, el grano verde comienza a adquirir un color marrón y se producen una serie de reacciones complejas en el café. Junto con varios subproductos de la reacción de Maillard, en el proceso también se crea acrylamide (AA). Las evidencias de la presencia de este compuesto cancerígeno fueron publicadas por primera vez en productos ricos en almidón [26], luego se detectó en el café molido e instantáneo ya que parece originarse después del tratamiento térmico que es necesario para liberar su aroma y sabor particular [27]. Luego se establecieron niveles de referencia (BML) para promover la reducción de la presencia de AA en los alimentos, ya que el contenido promedio en el café permanece en 400 µg/kg según el informe del Reglamento (UE) 2017/2158 de la Comisión [28].

Es de común conocimiento otro tipo de problemáticas que también afectan la inocuidad del café. En general, en los cultivos de café se utilizan plaguicidas para evitar enfermedades que afecten la calidad y cantidad de la producción. En el producto final, los residuos pueden llegar hasta el consumidor, y aunque sólo algunos productos fitosanitarios están registrados para el café, cualquier mal uso eventual o simplemente la filtración subterránea desde la montaña o colinas empinadas adyacentes a los cultivos, pueden generar un tipo de contaminación cruzada no intencional, por lo cual la detección de contaminantes en general es esencial para cumplir con las regulaciones. Por otro lado, los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) representan una clase importante de carcinógenos, su presencia en los alimentos debería ser lo más baja posible. El Comité Científico de la Alimentación (SCF) de la UE ha identificado 15 HAP que son motivo de gran preocupación para la salud humana [29]. A pesar de que siempre se ha prestado especial atención al benzo[a]pyrene, altamente cancerígeno [30], sus niveles máximos y la suma de benzo(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene y crysene (conocidos como el grupo "PAH4") se especifican en el Reglamento de la Comisión, UE 835/2011 en una gran variedad de productos alimenticios. Con excepción de los suplementos nutricionales, los HAPs son analizados en la mayoría de las categorías de alimentos, tal como se encuentra regulado en la actualización más reciente de la Comisión Europea (EC) 915/2023. No obstante, a pesar de que se incluyen productos similares como el cacao, el café aún no se encuentra en este listado.

## Planteamiento del problema

La dinámica de mercado del café suele ser compleja y normalmente el precio internacional impacta al agricultor de manera indirecta en las regiones productoras. En medio de una grave crisis del precio del café, el CONPES 3418 [31] impulsó de manera estratégica procesos de innovación en la cultura cafetera a través de la diferenciación. Encaminados a una reconversión táctica hacia la calidad en taza y como carta de navegación, se elevó el impacto del producto y sus descriptores sensoriales en el marco del informe de la Comisión de Ajuste de la Institucionalidad Cafetera [32] y el programa de “Fortalecimiento de la Calidad del Café de Colombia” propuesto por el Gobierno Nacional. Gracias a la volatilidad usual del mercado, este *comodity* contaba con un precio apalancado por el dólar junto con otros factores. Sin embargo, en febrero del 2019 una nueva crisis tuvo eco, la producción cayó 8,7% frente al mismo periodo del año anterior, luego de pasar de 1,21 millones de sacos a 1,10 millones de sacos. A pesar de los números negativos relacionados con la producción, al comparar el mismo periodo las exportaciones del grano mantuvieron un buen comportamiento cerrando con un crecimiento de 14,4% y un 6% al contrastar el año cafetero anterior [33]. Es precisamente en este escenario en el que se evidencia el regreso del fenómeno denominado *Coffee Paradox* [1], un precio de mercado inferior a 1 USD desde finales de 2018 [34] que revive la coexistencia de precios bajos en los países productores en conjunto con el aumento de beneficios para distribuidores y que solo aumenta la brecha que separa al agricultor del producto final. Bajo tales circunstancias, desde el año pasado productores africanos han tenido que migrar a otros productos más rentables como el aguacate [35], asumiendo ineludiblemente todos los costos de implementación a gran escala desde la base productiva. Una situación similar se podría llegar a presentar en el sector cafetero colombiano. Así las cosas, el gremio de cafeteros manifestó, siendo un verdadero hito, la intención de retirar el café colombiano de la negociación en la bolsa de Nueva York (NYSE). Esta situación que puede tener más perjuicios que beneficios al dejar el producto sin estandarización y llevándolo a que se

negocie solo fuera de mostrador. En consecuencia, apostar todos los esfuerzos a una mejor oferta en términos de calidad e inocuidad es vital para el país, ya que además de la protección del consumidor, sólo se logrará un mayor precio si se demuestra a los compradores y *brokers* (intermediarios bursátiles) que la calidad del café colombiano es superior a la del café de referencia en la bolsa [36].

De esta manera queda claro que la calidad es ahora más que nunca un factor importante en la dinámica del mercado, y así mismo la inocuidad se perfila como aspecto crítico al ser un factor determinante en la negociación del producto a expensas del riesgo de rechazo. Por lo tanto y sabiendo que los atributos únicos del café del Tolima han logrado el reconocimiento actual con diferenciación en los estantes a nivel internacional, es imperativo invertir recursos y tiempo respecto a los aspectos en materia de inocuidad, ya que son asuntos decisivos de suma importancia en la negociación de mercancía. Sumado al carácter comercial estratégico del café, el soporte a la agroindustria cafetera redundará en iniciativas amigables con el ambiente tales como las asociaciones que de manera responsable trabajan para obtener la mejor calidad de café especial sostenible del Tolima [37] y al mismo tiempo asumir un rol ambientalmente responsable. Un ejemplo de esto son las iniciativas de conservación del hábitat de la ranita venenosa tolimense (*Andinobates tolimensis*), perteneciente a la familia *Dendrobatidae* del vertebrado más tóxico del mundo “la rana dardo dorada de Colombia” que fue declarada en estado vulnerable [38]. Estos esfuerzos hacia la cohesión del sector productivo más importante en la región del Tolima están en consonancia con el entorno y permiten fortalecer el tejido social alrededor del café como factor clave en el desarrollo responsable del país.

A principios de 2019, el gobierno nacional publicó el Documento CONPES 3957 como política para mejorar los estándares de calidad. Esta Política Nacional de Laboratorios destaca, de manera estratégica y respondiendo a requisitos legales, la necesidad de asegurar la inocuidad del café, como parte medular de la agroindustria y como mecanismo de beneficio múltiple en donde, además de las claras ventajas comerciales de los productores, son los consumidores los grandes beneficiarios [39]. Ahora bien, se requieren esfuerzos urgentes en cuanto al fortalecimiento de la capacidad de detección de residuos que puedan afectar la inocuidad del producto, como de los plaguicidas y otros productos de protección de cultivos, contaminantes de procesamiento, la OTA, y en particular su transformación hacia estructuras modificadas. Resulta evidente que la evaluación de las transformaciones de la OTA en café debe ser estudiada a profundidad de manera que el

riesgo de liberación de la toxina se pueda estimar con precisión para la puesta en marcha de acciones preventivas eficaces. A la fecha y a diferencia de otras micotoxinas [24], las formas modificadas de la OTA no han sido consideradas en la legislación europea, aun cuando un subregistro de la cantidad de OTA enmascarada puede representar, de hecho, incertidumbre en la estimación del riesgo para la salud del consumidor.

Los resultados de esta investigación deben contribuir a desarrollar la capacidad de análisis del país y a un mayor entendimiento de las formas en las que la OTA puede estar presente en el producto. Así mismo, es importante tener en cuenta que las infecciones de plantas y animales con microorganismos patógenos también están influenciadas por las condiciones ambientales. Por lo tanto, no se debe olvidar que el cambio climático tiene el potencial de repercutir directamente en la inocuidad alimentaria [13, 40]. Factores como la temperatura, la disponibilidad de agua y la humedad tienen efecto tanto en la cosecha como en la cadena logística que aumentan la probabilidad de contaminación fúngica y, por lo tanto, en una posible acumulación de micotoxinas, que pueden derivar en su transformación a formas no detectadas por los métodos de rutina. Precisamente, de la situación anterior deriva el adjetivo “*masked*” que indica que, a pesar de encontrarse presente y que se manifiesten afectaciones a la salud, no hay una correlación durante el monitoreo. Existen algunos precedentes importantes, por ejemplo, a finales de los años 80 se observaron hallazgos que indican que la zearalenona puede ser metabolizada en la planta, generando compuestos conjugados con un grado de toxicidad comparable y que su forma modificada es fácilmente hidrolizada durante la digestión en cerdos, liberando la aglicona que es la responsable de los efectos sobre la salud animal [41] y humana [42].

Bajo este escenario, los riesgos potenciales para la salud y para la dinámica de mercado del café son realmente serios. El estudio propuesto es pertinente ya que, al configurarse como un estudio pionero en el campo, cuenta con un alcance exploratorio secuencial similar al empleado en otras disciplinas [43] y que estuvo encaminado a la búsqueda de diferentes contaminantes, y, además, un enfoque especial en las transformaciones de la OTA como principal contaminante fúngico del café. En este aspecto, esta investigación implicó un estudio inicial centrado en la determinación de la micotoxina, seguido de una fase experimental para la caracterización y análisis de las posibles formas modificadas. Así mismo, se evaluaron una multitud de residuos de plaguicidas, contaminantes de procesamiento como la AA y los HAPs. Asimismo, se pusieron a prueba alternativas que permiten una determinación integral de estos contaminantes en pro de la inocuidad, con la

firme intención de que el sector cafetero se pueda preparar ante la inminente actualización de los estatutos claves para el comercio. La revisión constante de los contaminantes emergentes antes no considerados por las autoridades y de los últimos hallazgos científicos, dan cuenta de la importancia de estimar un riesgo latente para la salud que yace en la presencia de potenciales contaminantes en el café. No obstante, es importante reconocer que el análisis de cientos de plaguicidas puede resultar complicado porque las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos varían ampliamente. Desde la investigación hasta la rutina, poder diferenciar los analitos reales entre los compuestos endógenos en esta compleja matriz puede convertirse en una tarea desafiante. Por ejemplo, los laboratorios suelen invertir recursos en diferentes métodos individuales (*single residue methods*, SRM) para abordar la OTA y la AA por separado; sin embargo, un método de residuos multiclase que incluya productos de protección de cultivos podría ser una gran ventaja para una rápida toma de decisiones. Ahora bien, aunque la espectrometría de masas con analizador de triple cuadrupolo (QqQ) brinda una sensibilidad incomparable [44], la identificación y confirmación mediante una combinación de modos de adquisición basados en espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) puede brindar mayor confianza, consolidándose como un factor clave para un alcance más amplio sumado al potencial del análisis retrospectivo [45, 46]. Además, con relación al desarrollo de métodos, los organismos de control buscan continuamente nuevos procedimientos para identificar con precisión los peligros y verificar el cumplimiento, centrándose en simplificar la preparación de muestras siempre que sea posible.

Del mismo modo, vale la pena resaltar que los HAPs también son contaminantes de interés abordados en este trabajo, ya que son un grupo de compuestos químicos que presentan un potencial riesgo para la salud humana, pues se sabe que son altamente cancerígenos y representan un riesgo considerable a la inocuidad química del producto. Los niveles máximos de HAP y otros contaminantes alimentarios en diferentes productos alimenticios se establecen en el Reglamento (UE) 2023/9152 [21]. A pesar de que se ha demostrado que muchos de estos compuestos son genotóxicos, no es necesario analizarlos individualmente, pero esta legislación impone límites a la presencia del grupo indicador PAH4. Numerosos estudios han sugerido que los HAPs pueden formarse en el proceso de tostado o pueden ser el resultado de la contaminación ambiental de los granos de café, aunque en el caso de los hallazgos en té negro, los contenidos están asociados al tipo de procesamiento y el secado de las hojas [47–53].

## ***Hipótesis***

Hay una posible presencia de residuos de plaguicidas, micotoxinas y contaminantes de procesamiento que se relacionan como descriptores de inocuidad química claves en la poscosecha de la cadena de producción del café del departamento del Tolima.

## ***Pregunta de Investigación***

¿Cómo se pueden determinar los posibles residuos de plaguicidas, micotoxinas y contaminantes de procesamiento que se relacionan como descriptores de inocuidad química claves en la poscosecha de la cadena de producción del café del departamento del Tolima?

## Objetivo General

Investigar los descriptores de inocuidad química que son clave en la poscosecha de la cadena de producción del café a través del desarrollo de técnicas de análisis basadas en marcado de isótopos estables (SIL) para determinar residuos de plaguicidas, micotoxinas y contaminantes de procesamiento en muestras provenientes del departamento del Tolima.

## Objetivos específicos

1. Determinar OTA en diferentes etapas del procesamiento del café mediante el desarrollo y validación de un método analítico para su detección y cuantificación.
2. Evaluar la presencia de posibles estructuras modificadas de OTA a través de métodos basados en SIL para la identificación de su composición en diferentes clases de café de las cuatro regiones cafeteras del departamento del Tolima.
3. Estudiar la incidencia del procesamiento sobre los contaminantes y productos de transformación potencialmente formados por medio de su evaluación en diferentes etapas y tipos de muestras de café.
4. Proponer una estrategia para determinar los descriptores de inocuidad química del café a través del desarrollo y validación de una metodología integral basada en SIL para determinar residuos de plaguicidas y micotoxinas, además de posibles productos de transformación que puedan ser generados en las etapas de procesamiento como los HAPs y la AA.



Adicionalmente, se realizó una revisión de artículos publicados con el término *Mycotoxins* en conjunto con las palabras “*masked*” y “*modified*”, los resultados luego se refinaron al incluir los términos LC-MS<sup>3</sup> y HRMS<sup>4</sup> realizando una búsqueda con operadores de sintaxis *booleana* [59]. Finalmente se acotó la búsqueda al incluir el término OTA, con lo cual el número de artículos se redujo sustancialmente, al punto no se obtuvo resultados de publicaciones en las bases de datos más indicadas para una recopilación bibliográfica eficiente [60, 61]. Ahora bien, aunque no hubo hallazgos específicos del tema de estudio, esto no quiere decir que no se haya encontrado información relacionada con otras especies o productos; por ejemplo, la determinación de desoxyvalenol 3-gulucósido se destaca en puerro, trigo y té con hallazgos relacionados con el término “*masked mycotoxin*” [62], así como la identificación de su producto de descaboxilación junto con OTA-ethylamide, moléculas relacionadas con la formación de las allí nombradas “*modified mycooxins*” en diferentes etapas de maduración de la uva [63]. En general, los resultados indican que existen pocas publicaciones relacionadas con el tema y, en particular, respecto a la OTA y el café solo hay hallazgos de un producto de degradación térmica en plasma a alta concentración [64, 65], y un estudio que revela la unión con derivados de la celulosa [56]. Por otro lado, información diversa para otros tipos de micotoxinas si se encuentra, puesto que ya vienen siendo reguladas en Europa [24].

Se pueden distinguir dos estrategias para el estudio de estos metabolitos, por un lado, están los métodos de análisis con un enfoque general no definido (*non-targeted*) y por el otro, los que cuentan con un enfoque particular o previamente definido (*targeted*). Como su nombre lo indica, las aproximaciones generales no cuentan con un enfoque definido por una hipótesis previa, sino que revisan el espacio metabólico en búsqueda de elementos o relaciones de las que no se tiene información y es precisamente de este modo en que se puede generar una hipótesis a probar a través de un enfoque particular definido. El uso de HRMS permite realizar un análisis con un enfoque general no definido, teniendo en cuenta que se hace la adquisición de la mayor cantidad de información (MS1<sup>5</sup> y MS2<sup>6</sup>) en alta resolución. El análisis de los datos generados puede hacerse para encontrar aspectos

---

<sup>3</sup> *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*

<sup>4</sup> *High Resolution Mass Spectrometry*

<sup>5</sup> Espectrometría de masas sin fragmentación inducida por colisión: “*Full Scan*” o *single stage acquisition*.

<sup>6</sup> Espectrometría de masas con fragmentación inducida por colisión: *tándem* o MS/MS.

nuevos que no se conocen previamente. Así mismo, en caso de que se desee buscar información puntual en datos ya adquiridos por HRMS, se puede usar una de las estrategias de análisis retrospectivo [66], originalmente llamada *post-target* [67–69] y que ahora se ha renombrado de manera conjunta con el modo de adquisición como *non-target acquisition target analysis* (nDATA) [70] para dar una idea global de las ventajas y limitaciones del esquema de trabajo. Este tipo de análisis permite hacer una revisión de compuestos limitada sólo por su capacidad de ionizarse en la interfaz (p.e. ESI, APCI, APPI)<sup>7</sup> y por la extensión de la base de datos. En este flujo de trabajo el análisis de datos se realiza con información *a priori*, datos compilados en una lista con compuestos que son buscados por medio de filtros y que, en caso de coincidencias, se procede con la revisión de criterios de confirmación al detalle. En este sentido y pese a que el análisis de los datos tiene un enfoque definido, aquí es donde la ventaja de trabajar en el modo de adquisición *Data Independent Acquisition* (DIA) se pone de manifiesto. En este modo de adquisición en el que no se define transiciones previamente, es posible aprovechar toda la información adquirida en MS2 para hacer un análisis retrospectivo si se hayan nuevas hipótesis a probar. Lo anterior difiere de los flujos de trabajo *target acquisition target analysis* (tDATA) donde múltiples transiciones secuenciales o *Single Reaction Monitoring* (SRM) se acomodan de manera muy eficiente y sensible, pero que no permiten realizar búsquedas a parte de las condiciones predefinidas antes de la adquisición.

En términos generales, los datos adquiridos en MS1 consisten en la separación ortogonal de los compuestos en el tiempo (cromatograma) y en masa (espectro) de los iones producidos en la interfaz y que, junto a su abundancia, forman una matriz tridimensional que constituyen los datos a analizar. En esta matriz, las señales adquiridas son picos que tienen una combinación única de tiempo de retención y relación *m/z*, conocidos como *features* [71]. Estos *features*, características o rasgos de la matriz constituyen, en principio, lo que se denomina como una pieza de información o “*unknown*” [72] ya que pueden representar compuestos desconocidos, pero realmente también podría tratarse de artefactos o contaminantes del sistema y no de la muestra, es decir *features* sin relevancia biológica. Por otro lado, los rasgos que sí podrían jugar un rol importante y que son candidatos a la asignación de identidad a través de la anotación pueden entenderse como “rasgos metabólicos”. En este sentido, un metabolito puede producir varios rasgos

---

<sup>7</sup> *Electrospray ionization (ESI), Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI), Atmospheric Pressure Photo Ionization (APPI)*

metabólicos asociados a su identidad, estos rasgos individuales forman lo que se denomina un *feature group* que representa al metabolito [73]. La complejidad de esta matriz es tal, que para lograr extraer las señales se debe realizar una rutina automatizada. En el desarrollo de un método por GC-MS<sup>8</sup> [74], se realizó la identificación de analitos por medio de información estructural por ionización estándar EI<sup>9</sup> y los resultados se analizaron con el software AMDIS<sup>10</sup> a través de la deconvolución de espectros de menor complejidad. Sin embargo, en LC-HRMS los algoritmos desarrollados a principios de la década como XCMS [71] o MetAlign [75] realmente abordan un reto mayor, lograr recopilar información, generar *feature groups* y sugerir fórmulas de los iones detectados que son originados en una interfaz bajo un mecanismo no específico, y que, además, exhibe un efecto matriz marcado y muy complejo [76, 77]. El reconocimiento de las señales adquiridas no es un proceso simple, a pesar del refinamiento permanente de los algoritmos se genera una gran cantidad de falsos positivos que requieren un filtrado adicional que, por su magnitud, también debe ser automatizado [78]. Las últimas herramientas automatizan el proceso para obtener mejores resultados para su interpretación estadística [79]. No obstante, hay que recordar que se trata de sólo una identificación tentativa o anotación putativa, ya se requiere el estándar si se desea alcanzar el mayor nivel de confianza [80].

En general, la posibilidad de realizar la anotación de una fórmula a un rasgo metabólico depende en gran medida de la capacidad una alta exactitud en la medida (<5 ppm), capacidad asociada, en cierta medida, a un alto poder de resolución (p.e.: 70000 FWHM @ m/z 200). Sin embargo, se ha demostrado que la combinación de átomos que origina el número de compuestos posibles aumenta con la masa, dificultando la anotación incluso con una exactitud < 1 ppm [81]. A pesar de esto, trabajar en alta resolución confiere un alto grado de selectividad que permite, por ende, la adición de ciertas restricciones como por ejemplo emplear el patrón isotópico. El patrón isotópico restringe de manera significativa el número de fórmulas probables, y está incluido como factor clave en las llamadas “*Seven golden rules*” [82]. Junto a la masa, el aprovechamiento de la información que aporta el patrón isotópico puede ayudar a la identificación efectiva de rasgos de interés particular dentro de la complejidad propia de este tipo de aplicaciones. La IUPAC define como patrón isotópico al conjunto de picos relacionados con iones con la misma fórmula química, pero

---

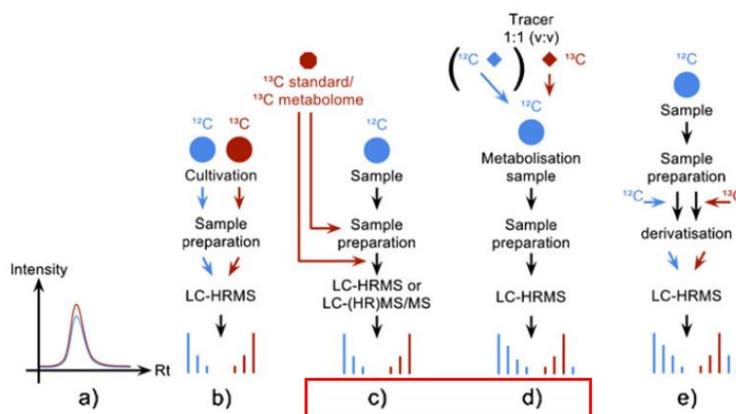
<sup>8</sup> Gas Chromatography – Mass spectrometry

<sup>9</sup> Electron ionization

<sup>10</sup> Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS)

que están formados por diferentes isótopos, núcleos que difieren en su masa en el número de neutrones. Por otro lado, las moléculas que difieren el número de sustituciones con isótopos ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{CH}_3^2\text{H}$ ,  $\text{CH}_2^2\text{H}_2$ ) se denominan isotopólogos [83]. El conjunto de picos que se observan junto a la masa monoisotópica (M) son isótopos estables y su relación de abundancias indica la proporción en la que se encuentran estas especies en la naturaleza. El patrón característico entre el isotopólogo con átomos  $^{12}\text{C}$  (M) y el reemplazo por un isótopo  $^{13}\text{C}$  (M+1) es el patrón isotópico característico que normalmente se observa en los espectros e indica la proporción en la que se encuentran estas especies en la naturaleza. La técnica de marcado con isótopos estables (SIL<sup>11</sup>), originalmente usada en proteómica [84] emplea un medio nutritivo enriquecido con un isótopo en particular ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) que incorporaba aminoácidos (SILAC<sup>12</sup>) al organismo *in vivo* para poder fijar estos átomos en compuestos marcados con una proporción diferente a la natural (M'). Este enriquecimiento es global, ya que todos los compuestos derivados cuentan con átomos de la misma fuente que se encuentran fijados en el organismo. El isótopo estable del carbono  $^{13}\text{C}$ , a diferencia de otros átomos (p.e.:  $^2\text{H}$ ,  $^{18}\text{O}$ ), no participa en reacciones espontáneas de intercambio isotópico [85]. Por consiguiente, el enriquecimiento *in vivo* a partir de  $^{13}\text{CO}_2$  o una fuente con todos los átomos marcados da lugar a la incorporación del isótopo al metabolismo de modo tal que todas las moléculas quedan marcadas de manera uniforme (U), exhibiendo isotopólogos (M'-1) donde en el isotopólogo, un  $^{13}\text{C}$  es reemplazado con un isótopo  $^{12}\text{C}$ .

**Figura 0-2:** Estrategias basadas en el uso de SIL en metabolómica para asistir a las estrategias de determinación de compuestos relacionados. Tomado de [86] <sup>13</sup>



<sup>11</sup> Stable Isotope Labeling

<sup>12</sup> Stable isotope labeling by amino acids in cell culture.

<sup>13</sup> a) Sustancias enriquecidas  $^{13}\text{C}$  con forma y tiempo retención igual. b) Anotación de un organismo que ha sido cultivado en un medio enriquecido  $^{13}\text{C}$ . c) Cuantificación absoluta usando un estándar marcado auténtico. d) Experimento metabólico usando un trazador natural y uno marcado. e) Derivatización empleando agentes naturales/marcados. En el desarrollo del estudio se hará uso de las estrategias a, c y d.

Estos son conceptos claves para entender la manera en que las estrategias de la Figura 2 permite reconocer la identidad del trazador y el número de carbonos marcados que conserva. Las estrategias de mayor interés para la detección de los productos de transformación de la OTA se encuentran en el recuadro rojo, específicamente para la cuantificación (c) y en las fases de exploración de las transformaciones (d) durante el almacenamiento y el procesamiento.

Por otro lado, en abril de 2002, la Universidad de Estocolmo y la Administración Nacional de Alimentos anunciaron conjuntamente en una conferencia de prensa celebrada en Estocolmo los hallazgos sobre altas cantidades de AA en varios alimentos cocinados comunes. Desde entonces, la determinación de AA sigue siendo un desafío para algunos productos, especialmente en el café [87]. Adicionalmente, a pesar de que reportes recientes abordan la presencia de otros contaminantes de interés en café tostado como los HAPs [88], resulta interesante destacar que a pesar de que para el cacao en grano y productos derivados si se ha hecho un estudio extensivo por cerca de 13 años con excelentes resultados en el marco de la aplicación del “Código de prácticas para la reducción de la contaminación de los alimentos con HAP procedentes de procesos de ahumado y secado directo” en los países productores de cacao [89], realmente los HAPs son raramente incluidos en la regulación del café y han sido pocas las ocasiones en las que su análisis se incluye como parte estructural de la evaluación de su inocuidad, como en el caso del Instituto de Estándares de Alimentos de Australia y Nueva Zelanda (FSANZ) que ha incorporado el análisis de HAPs, junto a la AA y la OTA empleando métodos convencionales [90]. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos métodos para su análisis resulta de importancia táctica para abordar un desarrollo integral del alcance de este trabajo.

# 1. Capítulo 1: Métodos

En particular, las métricas de la *Green Chemistry* o química verde [91] son consideradas cada vez más como un factor crucial a tener en cuenta en el desarrollo de métodos. La “Ecoescala Analítica” es un enfoque semicuantitativo que se ha popularizado, sin embargo, solo tiene que ver con el impacto de los solventes utilizados [92]. Por otro lado, GAPI<sup>14</sup> es un método integral que evalúa todo el flujo de trabajo, aunque realmente la mayoría de los métodos de estimación del impacto ambiental no cubren la síntesis antes de la preparación de la muestra. En la búsqueda de enfoques más ecológicos como alternativa a los métodos actuales que utilizan grandes cantidades de solventes tóxicos y desechos por muestra, es clave prever un enfoque verde y amigable con el medio (*eco-friendly*) al evaluar tantos aspectos como sea posible durante el desarrollo para seleccionar una solución que ayude a mitigar el impacto que los métodos analíticos suele tener sobre el medio ambiente. Este estudio tiene como objetivo explorar las amenazas a la inocuidad química del café y, por lo tanto, desarrollar un enfoque relevante, integral y adecuado para los contaminantes clave en el café tostado, pero desde una perspectiva respetuosa con el medio ambiente que idealmente logre abarcar un alcance multiclasa.

## 1.1 Materiales

### 1.1.1 Productos químicos, estándares y consumibles

La OTA de alta pureza se adquirió de Sigma-Aldrich (Saint Louis, EE. UU.) y se preparó a 500 µg/mL en acetonitrilo (ACN) grado LC-MS. La mezcla de aflatoxinas (2 µg/mL B1 y G1, 0,5 µg/mL B2 y G2, en ACN) se adquirió de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). Se prepararon estándares internos marcados con isótopos estables (ILIS) de AA-d<sub>3</sub> (98 %) de

---

<sup>14</sup> *Green Analytical Procedure Index*

Polymer Source Inc. (Dorval, Canadá), AA-  $^{13}\text{C}$  (99 %) de CDN Isotopes Inc. (Pointe-Claire, Canadá) a 10 mg/mL en agua de calidad HPLC y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La OTA -  $^{13}\text{C}_{20}$  (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en ACN) se adquirió de Sigma-Aldrich (Saint Louis, EE. UU.). Además, se adquirió atrazina- $\text{d}_5$  (99,0 %) de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania), se preparó a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en ACN grado LC-MS y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se preparó una solución de trabajo con aproximadamente 700 compuestos a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cinco mezclas estándar disponibles comercialmente del kit estándar Smart Solutions <sup>TM</sup> v700 PestiMix de Dr. Ehrenstorfer - LGC (North Charleston, EE. UU.), que estaban originalmente a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El estándar multianalito final se preparó antes de los experimentos de adición mezclando las soluciones de trabajo intermedias para diluirlas hasta 50 ng/mL para poder fortificar con volúmenes razonables (es decir: a 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  con 10  $\mu\text{L}$ ). Las soluciones de trabajo diluidas a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fueron preparadas a partir de una solución mezcla de 16 HAPs (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en ACN/acetona/tolueno a 6:3:1) de Agilent Technologies (Palo Alto, EE. UU.), una solución comercial para el método EPA 525 de 4 HAPs perdeuterados (2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en diclorometano) adquirida de Dr. Ehrenstorfer -LGC (North Charleston, EE. UU.) y otra de 13 HAPs perdeuterados (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en ciclohexano) adquirida de Teknolab A.B. (Kungsbacka, Suecia). Todas las soluciones se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El metanol (MeOH) de calidad LC-MS se adquirió de Scharlau (Barcelona, España), el acetato de etilo grado residuos (AcOEt) y el ACN grado LC-MS se adquirieron de JT Baker (Radnor, EE. UU.). Se consiguió agua de grado tipo I (18,2 M $\Omega$ ) a partir de un sistema de purificación de agua Direct Q de Merck (Darmstadt, Alemania). El ácido gálico se adquirió de Merck Schuchardt OHG (Hohenbrunn, Alemania), D (+)-glucono-1,5-lactone de Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EE. UU.), D (-)-sorbitol de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) y sacarosa de Supelco (Bellefonte, PA, EE. UU.). El adsorbente de sílica modificada con amina primaria secundaria, Bondesil <sup>®</sup> PSA (ethylenediamine-N-propyl) y el carbón grafitizado (GCB), se adquirieron de Agilent technologies (Santa Clara, EE. UU.), el Isolute <sup>®</sup> ENV+ de Biotage (Uppsala, Suecia). El ácido fórmico y el formiato de amonio de grado LC-MS se adquirieron de Scharlau (Barcelona, España), el carbonato de amonio, el florisil y el óxido de aluminio de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania), los filtros para tubo de centrifuga Spin-X<sup>®</sup> se adquirieron de Corning (Glendale, EE. UU.) y se adquirieron filtros de poliamida (0,2  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, 13 mm) de Sartorius Stedim Biotech GmbH (Goettingen, Alemania).

### 1.1.2 Muestras

El departamento del Tolima en Colombia tiene la ventaja de tener una cosecha principal y una segunda cosecha llamada “mitaca”, menos abundante, pero que se encuentra dispersa en todo el territorio. Las muestras crudas se recolectaron en enero de 2022 en fincas rurales cercanas al municipio y se etiquetaron de manera correspondiente. Las tres regiones están ubicadas en áreas separadas a diferentes altitudes. Las siguientes coordenadas y elevación muestran el origen de las muestras recolectadas: San Juan de la China a 4°32'27.6"N 75°04'30.0"W (SJ), 2000 msnm; San Antonio a 3°55'12.0"N 75°29'24.0"W y 1500 msnm (SA); y, Líbano a 4°54'43.6"N 75°00'12.2"W, 1400 msnm (LB). De cada localidad, se muestrearon tres tipos diferentes de granos de café que representan un procesamiento diferencial o también llamado “*beneficio*”: natural (N), *honey* (H) y café lavado (W). Los ítems del ensayo de aptitud (PT) de las rondas del programa de química de alimentos de FAPAS®, de muestras de café molido e instantáneo, se adquirieron de Fera Science Ltd. (York, Reino Unido), se almacenaron a -20 °C hasta su uso y no se sometieron a ningún pretratamiento particular y se utilizaron sin procesamiento adicional. La torrefacción es un proceso de tostado en el que se añade azúcar que pretende mejorar el amargor y enmascarar los sabores negativos [93–96]. Se compraron muestras comerciales de café tostado y torrefacto en granos enteros en mercados locales de varios lugares, se transportaron y homogeneizaron mediante un procedimiento de molienda convencional a temperatura ambiente poco después de abrir el paquete. Estas muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso en los experimentos de extracción y limpieza y con fines de validación.

## 1.2 Condiciones instrumentales

### 1.2.1 LC-HRMS

Se realizó una separación cromatográfica seguida de un análisis de espectrometría de masas en un UHPLC Dionex™ Ultimate 3000 (Thermo Scientific™, San José, CA, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas Q Exactive™ Focus (Thermo Scientific™, Bremen, Alemania). La fase móvil A y la fase móvil B consistieron en una mezcla de 98% de agua + 2 % de MeOH y 98 % de MeOH + 2 % de agua, respectivamente. Los aditivos para ambas fases móviles consistieron en formiato de amonio 5 mM con la adición de ácido fórmico al 0,1 % para mejorar la ionización. La separación se realizó en una columna UHPLC de fase estacionaria C18 Accucore aQ (Thermo Scientific™, San Jose, CA, USA) de longitud, diámetro y tamaño de partícula de 100 mm, 2,1 mm y 2,6 µm, respectivamente. Se conectó una precolumna a la columna con la misma fase estacionaria y las dimensiones correspondientes y se utilizó un loop de 100 µL que conectaba la precolumna con la válvula del muestreador automático para mejorar la forma del pico de los compuestos de elución temprana. La temperatura del compartimiento termostataado de columnas se ajustó a 30°C durante el análisis. El flujo utilizado fue de 300 µL/min, el volumen de inyección fue de 10 µL y el muestreador automático se mantuvo a 10°C. El gradiente comenzó con 100% de A. Después de 1 min, el porcentaje de B se incrementó al 40%, seguido de otro incremento al 70% a los 3 min, y finalmente alcanzó el 100% a los 7 min. Esta última composición se mantuvo adicionalmente durante 5 min y luego se redujo a 0% en 0,1 min, finalmente se mantuvo durante 2 min para permitir el equilibrio de la columna para la siguiente ejecución, el tiempo total de ejecución fue de 15 min. El espectrómetro de masas estaba equipado con una fuente de ionización tipo *heated electrospray* (HESI II). Los parámetros de la fuente HESI II se optimizaron anteriormente [97] y se configuraron de la siguiente manera: voltaje de *electrospray* de 3,5 kV en modo positivo, flujo de gas de nebulización (*sheath gas*) 35 unidades arbitrarias (au), flujo de gas auxiliar 12 au, flujo de gas de barrido (*sweep gas*) 0 au, temperatura del tubo de transferencia o capilar de 210°C, temperatura del gas auxiliar de 350°C y radiofrecuencia del S-lens de 50. Diariamente se realizó una calibración

de masa externa con una mezcla de n-butylamine, caffeine, Ultramark 1621 y MRFA<sup>15</sup>. Si no se indica lo contrario, el análisis de los datos siempre se realizó con el software TraceFinder v4.0 (Thermo Scientific™, San José, CA, EE. UU.). La configuración de los parámetros para la adquisición de datos en el analizador orbitrap se variaron según el tipo de experimento y se puede encontrar descrita detalladamente en el Anexo A - [Tabla A1](#) como intercambio de polaridad en *Full Scan* (FS) codificada como “Método 1”, *Full Scan - Data dependent MS2* (FS-ddMS2) como “Método 2”, *Parallel Reaction Monitoring* (PRM) “Método 3”, y *Full Scan – wide Parallel Reaction Monitoring* (FS- wPRM) o “Método 4”.

### 1.2.2 GC-MS/MS

Las soluciones con HAPs se empacaron siempre en viales color ámbar y se analizaron con un cromatógrafo de gases modelo 8890A de Agilent Technologies acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (MS/MS) 7000D (Palo Alto, CA, EE. UU.). El sistema estaba equipado con un inyector Multimodo (MMI), control electrónico de presión (EPC) en el puerto de inyección y un automuestreador 7693A equipado con una jeringa de 10 µL. Se utilizó el software MassHunter® mejorado para el control del instrumento y el análisis de datos. Las condiciones de separación no fueron optimizadas, sino que fueron escogidas haciendo pruebas preliminares basadas en notas de aplicación del fabricante con el objetivo de contar con la separación más eficiente y que no superara los 20 min. El modo de inyección fue *Splitless Pulsado* (SLP), la temperatura se mantuvo a 320 °C y la presión a 10,722 psi, con un pulso de presión de 50 psi hasta 0,9 min, un flujo de purga del *septum* de 3 mL/min, un flujo de 50 mL/min por la válvula de división (*split*) a 1 min pasando posteriormente al modo de ahorro de gas a 20 mL/min después de los 2 min. Se usó un inserto de vidrio *Ultra Inert* tipo *splitless* de 800 µL (5190-3983). El análisis de GC se realizó a 1,2 mL/min en modo de flujo constante en una configuración de dos columnas capilares HP-5MS *Ultra Inert* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) de 15 m, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de película acopladas con un conector de cuarzo y He como gas de arrastre. Para el espectrómetro de masas se utilizaron las siguientes condiciones: ionización por impacto electrónico a 70 eV, tiempo de retraso del encendido del filamento (*solvent delay*) de 2,25 min, temperatura de la línea de transferencia en 320

---

<sup>15</sup> Péptido de referencia para la calibración (Met-Arg-Phe-Ala)

°C y la temperatura del cuadrupolo se mantuvo en 150 °C. El flujo de la celda de colisión se mantuvo en 1,5 mL/min de N<sub>2</sub> y el gas de *Quenching* en 2,25 mL/min de He. El programa de temperatura del horno inició con 75 °C durante 1 min; luego una rampa de 40 °C/min hasta 170 °C seguida de una rampa de 10 °C/min hasta 310 °C y mantenida durante 3 min. El tiempo total de ejecución fue de 20,37 min y posteriormente durante el *postrun* se mantuvo la temperatura del horno a 325 °C por 2 min. En la primera parte del estudio, se utilizó el modo *Full Scan* (50–450 m/z) para explorar la composición de los perfiles de los extractos e identificar los tiempos de retención de los analitos en la configuración del método. No obstante, después de optimizar la energía de colisión (CE) de las transiciones seleccionadas en el modo de monitoreo dinámico de reacción múltiple (dMRM) se realizó la cuantificación en todos los experimentos con las condiciones de la [Tabla A6](#).

### 1.3 Validación

Para realizar la validación del método *All-in-one* (AIO) o “todo en uno” y del método de HAPs, se tuvo en cuenta el documento guía sobre identificación de micotoxinas en alimentos y piensos SANTE/12089/2016 [98], y toda la validación cuantitativa se realizó considerando SANTE/11312/2021 [99]. Se incluyeron los parámetros selectividad, linealidad, veracidad y precisión. Para evaluar la veracidad, la precisión y el límite de cuantificación (LOQ), las muestras se fortificaron con soluciones multianalito, mezclas que contienen los analitos en tres concentraciones diferentes, correspondientes a 0,005; 0,010 y 0,020 mg/kg. En particular, la OTA también se evaluó a 0,0025 mg/kg para evaluar el rendimiento del método por debajo de los niveles reglamentarios vigentes. Se utilizaron muestras de diferentes orígenes y características (robusta y arábica, tostado y torrefacto) para evaluar la aplicabilidad del método y su capacidad para ofrecer resultados confiables en algunas variedades del mercado de cafés especiales y además de cafés comerciales internacionales.

## 2. Capítulo 2: Ochratoxin A y formas modificadas

### 2.1 Condiciones preliminares para LC-HRMS

Las micotoxinas son conocidas como compuestos tóxicos para la salud animal y humana. Estos compuestos se consideran metabolitos secundarios que presentan estructuras químicas de diferente naturaleza, por lo cual exhiben un amplio rango de propiedades fisicoquímicas. Esta gran diversidad representa un reto para los métodos analíticos ya que puede afectar de manera significativa la robustez y sensibilidad en los métodos de rutina. Se analizó un grupo de micotoxinas usadas como modelo de diferentes clases en modo de intercambio de polaridad (Método 1). Lo anterior debido a que la aflatoxin B (AFB) presenta ionización en modo positivo, mientras que la altertoxin (ATX), el alternariol (AOH) y el alternariol 9-methyl ether (AME) en modo negativo. En particular, en el caso de la OTA se presenta ionización en ambas polaridades. En el Anexo A, la [Figura A1](#) muestra un diagrama de distribución de especies en donde se observa que a un pH cercano a 3 coexiste la especie ácida, en conjunto con la especie desprotonada que da lugar a la detección de la especie [M-H]. El efecto de factores como la composición de la fase móvil en la respuesta ya ha sido evaluada [100], y se ha encontrado que los grupos con mayor afinidad por esta tienden a disminuir la respuesta. Por esta razón se realizó la comparación entre el uso de ACN con HCOONH<sub>4</sub> 5 mM y HCOOH al 1%, respecto al uso de MeOH el cual se consideró como referencia y con los mismos aditivos. La evaluación preliminar de la eficiencia de ionización para el grupo de micotoxinas con respecto al solvente y la presencia de matriz se calculó como la relación de las pendientes de curvas de calibración, aquí “efecto de ionización” (%IE) en la sección b y c. La respuesta en solvente puro (ACN y MeOH) siempre mayor con MeOH en HESI, mientras que en APCI se observa un comportamiento diferencial, que, para el caso de la OTA, da cuenta de una mayor eficiencia de ionización empleando ACN (%IE<sub>ACN/MeOH</sub> >> 100%). No obstante, esto puede deberse a que en esta parte del estudio se usaron condiciones manuales de las sondas

HESI y APCI que fueron ajustadas a partir del software del fabricante sin estar previamente optimizadas.

Así como en solvente puro, para la comparación solvente vs. matriz (extracto de prueba) el caso de la OTA también tiene un comportamiento distinto a los de las demás micotoxinas empleando la sonda HESI y MeOH. A pesar de que el ACN ayuda a minimizar el efecto matriz como se muestra en c), al mismo tiempo resultó claro que en HESI el uso de MeOH tiene una mayor eficiencia generalizada. Esta situación es similar a los hallazgos publicados con condiciones instrumentales optimizadas para moléculas de baja polaridad, en principio candidatos ideales para ser determinados con la sonda APCI, pero que, en la práctica, tiene una sensibilidad limitada [101], a pesar de presentar menos efecto matriz. En conclusión, se escogió la sonda HESI empleando MeOH como solvente base de la fase orgánica para la determinación de la OTA ya que para esta molécula no se encontró evidencia de una competencia tan fuerte que pudiera llevar a un efecto matriz marcado, al menos en estas condiciones de prueba preliminares con el extracto de matriz genérica a base de material vegetal de alto contenido de agua.

## 2.2 Evaluación enfocada en la OTA

En la primera parte del estudio la evaluación incluyó el uso de los diferentes tipos de café crudo o sin tostar (H, N, V) con el fin de identificar cualquier posible conjugación de OTA durante el almacenamiento. El potencial para liberar la micotoxina puede aumentar la toxicidad, por lo que los compuestos objetivo son cualquier producto de transformación de la OTA que mantenga los átomos marcados de una fuente conocida. Para lograr esto, se agregaron porciones de 1 g (entre 10 granos en promedio) por triplicado de cada tipo de café a 5 µg/kg tanto con OTA sin marcar, como con OTA-<sup>13</sup>C<sub>20</sub>; como se ha llevado a cabo en experimentos utilizando técnicas de marcado con isótopos estables en otros estudios [102–105]. La concentración que se utilizó para la fortificación desde el principio del experimento corresponde al nivel regulado. Se añadió a una muestra de café una solución con la misma fracción de solvente orgánico (sin OTA) y se utilizó como un control para detectar contaminación preexistente. Además, se incluyeron dos controles de calidad (QC) con 250 µg/kg y una versión diluida (dQC) de 25 µg/kg para considerar la concentración utilizada durante el experimento, que, por ser bastante baja, podría dificultar la detección. Las muestras se colocaron en matraces cónicos de 500 mL y se dejaron en la oscuridad en un horno de aire forzado en condiciones monitoreadas de exposición a humedad (40-

60) % y 40 °C durante 6 meses. Después de este período, todo el contenido se procesó con un molino hasta obtener un polvo homogéneo que se dejó en viales de vidrio en el congelador a -20 °C hasta su análisis. La extracción de la muestra se realizó el mismo día para todo el lote de muestras después de alcanzar la temperatura ambiente. En esta fase se investigó la capacidad de tres solventes (ACN, MeOH y H<sub>2</sub>O) y sus combinaciones para extraer los tres tipos de café. Se utilizó un diseño de experimentos (DOE) para proponer diferentes combinaciones para realizar la extracción y luego compararlas buscando lograr una capacidad de extracción máxima. Los diseños D-Optimal son una especie de método DOE pensado para minimizar la varianza generalizada de los coeficientes de regresión estimados. Este tipo de diseño es conveniente cuando existen limitaciones prácticas como el número de experimentos que es factible realizar o cuando no es posible que el espacio experimental se explore por completo. En este caso, las restricciones sobre la composición del solvente de extracción consisten en mantener un 50% de agua para evitar terminar con una combinación que corresponda a una extracción orgánica pura, y así las condiciones de la extracción se puedan parecer a la de una bebida, al menos en cierta medida. En este plan experimental, las pruebas a realizar se seleccionaron a partir de un diseño factorial completo (FFD) de varios niveles [106] creando una matriz de puntos candidatos que se muestra en la [Tabla A2](#). Se tomaron 200 mg de polvo en tubos de centrifuga de polipropileno de 50 mL y luego se agregaron 10 mL de cada una de las mezclas de solventes (S1 a S10) para realizar una extracción genérica y obtener diferentes perfiles de extracción que fueran lo más completos posible. Se realizó la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido por 10 min, luego los tubos se agitaron durante 1 min y se centrifugaron a 16000 g a 4 °C. El extracto crudo se filtró a través de filtros de 13 mm y 0,2 µm de poro sobre un vial de color ámbar para sumar 90 muestras fortificadas (3 tipos de café, 3 ubicaciones, 10 composiciones de extracción), sus 90 blancos correspondientes y ambos controles de calidad para quedar listos para la adquisición por LC-HRMS con el Método 1, explicado en la sección de condiciones instrumentales. Los blancos y las muestras se inyectaron de manera aleatoria junto con viales con solvente puro a intervalos regulares en la secuencia (cada 10 inyecciones). La inyección de la dilución del QC permitió verificar que la respuesta del sistema se mantuvo estable durante la secuencia. Con el objetivo de elegir unas determinadas condiciones para la extracción de la OTA, se evaluó el efecto de las diferentes mezclas de solventes usadas previamente. Además, para aprovechar la capacidad del enfoque *non-targeted* de la plataforma LC-HRMS que en principio no presenta un sesgo, se evaluaron los perfiles de matriz de café verde y tostado

obtenidos comercialmente, pero utilizando únicamente la composición que se seleccionó previamente como solvente de extracción. En este caso, vale la pena mencionar que en muchos estudios *non-targeted* de metabolómica en plantas se utilizan mezclas de solventes con o sin acidificación para la extracción y muestran resultados diferenciales [107], por lo que también se evaluó el efecto de la acidificación del solvente de extracción haciendo uso de ácido fórmico al 0,1%. Además de esto, el uso de adsorbentes para la limpieza también fue parte de este diseño experimental. Así fue como se evaluó el uso de adsorbentes altamente efectivos usados para extracción en fase sólida (SPE) como los son el Isolute® ENV+ y el Bondesil® PSA al mismo tiempo que la acidificación sobre ambas matrices, es decir, café verde, pero también café tostado. Por lo tanto, se colocaron 500 µL del extracto (acidificado y no acidificado) en diferentes tubos de polypropylene (PP) que contenían 50 mg de cada adsorbente con la cantidad de mezcla de solventes elegida en el diseño D-óptimo. La limpieza SPE tipo dispersiva se realizó con vórtex durante 1 min y se centrifugó a 16000 g a 4 °C. El extracto crudo se filtró a través de filtros de 13 mm de 0,2 µm de poro en un vial de color ámbar para inyección en LC-HRMS usando el Método de adquisición 2. Finalmente, la última parte de los experimentos que se basaron en una aproximación *non-targeted* se describe brevemente a continuación, y sus resultados se discuten en una sección posterior correspondiente. En este caso se abordó la formación de posibles formas modificadas de OTA, pero bajo condiciones intensas de calentamiento que contemplaron dos tipos de matriz, café tostado regular y torrefacto. La formación de conjugados de OTA se evaluó primero calentando cada una de las moléculas modelo (galic acid, D (+)-glucono-1,5-lactone, D (-)-sorbitol y sucrose) en mezcla con la OTA a 175 °C siguiendo un procedimiento ya descrito [56], para su posterior análisis por LC-HRMS mediante el Método de adquisición 1. Luego, se realizó un experimento de calentamiento usando la matriz de café contaminada artificialmente, pero esta vez solo para sacarosa, luego se extrajo usando mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) y se analizó con el Método de adquisición 3 para identificar productos a partir de precursores preseleccionados. Finalmente, se utilizó una variación del Método 1 para monitorear las señales seleccionadas en un experimento de calentamiento escalonado y, por último, para analizar muestras comerciales de café tostado y torrefacto tostado.

## 2.3 Modificaciones potenciales de la OTA durante el almacenamiento

Recientemente se han venido aplicado variaciones al proceso estándar de beneficio para el café verde en fincas de todo el territorio, lo que ha llevado a métodos personalizados, como los N, H, V, que incluyen los denominados procesamientos tipo "semiseco" [108]. Los productos de transformación de las micotoxinas son tan importantes como la toxina primaria y se podría contribuir a una evaluación integral de la inocuidad de los alimentos si se pueden incluir en el conjunto de analitos. El término "micotoxina modificada" denota diferentes formas en general e independientemente de su origen [25, 58], y considerando que los niveles de humedad de los tipos de café natural, *honey* y lavado pueden estar por encima de los niveles recomendados durante el almacenamiento, se planificó un estudio a largo plazo para buscar cambios que puedan "ocultar" la OTA en muestras contaminadas artificialmente. Una vez que finalizó el período de 6 meses, las muestras se sometieron a análisis con las 10 composiciones de extracción de la [Tabla A2](#). Se ejecutó el análisis del lote por LC-HRMS con los parámetros descritos en la sección "condiciones instrumentales" y el Método 1 para la adquisición de datos. Los archivos crudos (\*.raw) fueron analizados por el software MetExtract II [109], una poderosa herramienta que permite extraer *features* a través del análisis de señales Wavelet [110] y con el beneficio adicional de dirigir la atención sobre las *features* que estén "acreditadas" [111] utilizando el módulo TracExtract y a través del reconocimiento de patrones isotópicos [112] comparándolo con el patrón esperado para el compuesto marcado. Con excepción del módulo AllExtract, la suite realmente no está diseñada para detectar todos los metabolitos en el sistema, sino que solo se reportarán los productos relacionados con el trazador estudiado, por lo que de esta manera se descartan características endógenas (*features* que solo aportan ruido), ya que no están directamente relacionadas con el tratamiento. En el Anexo A, la [Figura A2](#) (a) muestra resultados para las diferentes ubicaciones (LB, SA, SJ), tipos (H, N, V) y los picos superpuestos de todas las mezclas de extracción con diferentes composiciones (S1-S10). En términos generales, las señales con correspondencia en la [Figura A2](#) (b) reflejan la mezcla 1:1 de  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -OTA. De todos los resultados que muestran *feature pairs* reportados por el software, la mayoría de los hallazgos no cumplen con la distancia de 20 carbonos, ni los picos marcados tienen correspondencia con una la señal del compuesto nativo. Para poder acreditar correctamente un *feature group*, un pico de la versión marcada debe coincidir con el tiempo de retención a la distancia especificada en el eje m/z del espectro,

como se muestra en la [Figura A2](#) (c y d) para el control de calidad, donde se observa el pico correspondiente de la OTA, tanto en polaridad positiva como negativa. A pesar de que se estaban usando mezclas de solventes que exhiben diferente polaridad, no se encontraron formas modificadas de OTA en ninguno de los tipos de café semisecos, aparte de la OTA que fue identificada correctamente por el Módulo TracExtract. Las métricas de los hallazgos se pueden encontrar en la [Figura A3](#). Esto puede indicar que el almacenamiento de granos de café contaminados artificialmente bajo las condiciones experimentales no condujo a formas modificadas que supuestamente permanecen sin detectar y eventualmente liberan la fracción OTA.

El diseño D-Optimal se utiliza en casos en los que los diseños clásicos no aplican [106] debido a la interacción natural que se espera entre los factores, justamente como en el caso de los componentes de una mezcla de solventes de extracción [113]. La selección de un modelo apropiado es subjetiva por naturaleza, realmente existen muchos parámetros en los que uno puede basarse para tomar la decisión de escoger entre un modelo u otro. A menudo, la verdadera función que describe la relación entre la respuesta y los factores se desconoce y normalmente esto depende de las limitaciones experimentales del diseño planificado. Sin embargo, el estadístico corregido de  $R^2$  podría ser una buena estimación para entender si, por ejemplo, un modelo de cuarto orden es el que mejor se ajusta al área de la OTA de cada combinación. Esto se puede ver en la salida del software R usando la función *MixModel* [114] en la [Figura A4](#) (a). Además, no se muestran tendencias visibles en los residuos estudentizados, [Figura A4](#) (b). Los puntos rojos en la [Figura A4](#) (c) muestran las composiciones de la matriz de puntos de las pruebas propuestas, las líneas de contorno y la superficie coloreada hacia la respuesta más alta. De manera similar, los resultados se analizaron utilizando el paquete estadístico DesignExpert™ v13 para construir la superficie de respuesta 3D en la [Figura A5](#) (a). Las posiciones relativas para cada mezcla se escalan a 1, y la composición ideal de la mezcla se calcula mediante la función de “Deseabilidad”, que se muestra con una bandera blanca cerca de 0,5 MeOH en la [Figura A5](#) (b). Este resultado sugiere que una mezcla de MeOH y H<sub>2</sub>O (1:1) es la mejor de las opciones probadas para la extracción de OTA. A menudo, se tiende a asociar señales de advertencia de la “suciedad” de un extracto a través de la comparación de cromatogramas de iones totales (TIC), diferencias basadas en el peso del residuo que queda después de la evaporación o también con el color del extracto [115–118] ya que estos enfoques han sido de ayuda para decidir entre los métodos de extracción y agentes

de limpieza durante años. Sin embargo, realmente los TIC de las diferentes mezclas se veían tan similares que es difícil decir cuál parece “más limpio”. De modo que, con el objetivo de evaluar los extractos de forma imparcial, los archivos sin procesar fueron analizados con el software Compound Discoverer™ 3.3 considerando los factores estudiados. La [Figura A6](#) muestra un diagrama de dispersión que compara los compuestos encontrados en las muestras SJ que fue extraída por la composición de solvente ACN y H<sub>2</sub>O (1:1, Mezcla 3) en contra de la mezcla de MeOH y H<sub>2</sub>O (1:1, Mezcla 4) como referencia. Este gráfico muestra una comparación de la forma de un “volcán” en la que una gran cantidad de compuestos en la zona sombreada en verde del lado izquierdo del eje x (3086) muestran diferencias significativas (valor  $p < 0,05$ ) y una cantidad relativa al menos 2 veces inferior que la mezcla elegida del diseño D-óptimo. Por el contrario, solo se ven relativamente pocos compuestos en la zona roja (243), presumiblemente porque se extrajeron en mayor medida por la presencia de ACN en la mezcla del ejemplo.

Vale la pena tener en cuenta que la última evaluación se realizó incluyendo todos los diferentes tipos de café al mismo tiempo, por lo que se ejecutó un nuevo ANOVA en la mezcla MeOH y H<sub>2</sub>O (1:1) comparando el café natural y el *honey* vs. el café lavado, como se muestra en la [Figura A7](#) (a y b, respectivamente). Así pues, aunque los TIC parecían prácticamente idénticos, el análisis diferencial con los granos de café lavados muestra una clara diferencia en los componentes extraídos del café natural, pero sólo pocos diferentes del tipo *honey*. Hay que reconocer que esto no es una sorpresa ya que el pericarpio debe agregar una composición significativamente diferente a la mera presencia del mesocarpio en el *honey*, así en apariencia no se vieran diferencias en los perfiles cromatográficos. Asimismo, esto también indicó que el perfil de la matriz del *honey* se asemeja a los compuestos extraídos del tipo de café lavado. La Tabla 2-1 resume las cantidades de compuestos en las diferentes mezclas de extracción probadas, y de manera individual o combinada de los tipos de café.

**Tabla 2-1:** Consolidado del conteo de compuestos con supresión/aumento respecto a la mezcla de referencia (Mezcla 4, MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1) <sup>16</sup>

Mezcla	Naturales (N)		Honey (H)		Lavado (V)		Entre N/H/V	
	Menor	Mayor	Menor	Mayor	Menor	Mayor	Menor	Mayor
1	888	5	780	66	827	50	1605	164
2	1638	12	1416	197	1505	112	2607	262
3	1910	15	1671	164	1789	101	3086	243
5	3260	93	1684	662	1825	64	3521	195
6	2510	3	1639	106	1806	96	3429	258
7	2331	13	1605	182	1078	6	1897	38
8	1081	0	1016	10	2184	125	4490	241
9	3102	22	1871	280	2796	61	4835	163
10	3351	12	2014	289	827	50	1605	164

Con solo un vistazo a la tabla se puede entender fácilmente que un patrón se repite en todos los tipos de café y para todas las mezclas de extracción que muestran más compuestos extraídos en menor proporción, y sólo unos pocos compuestos se extraen en mayor medida en comparación con la referencia. Este resultado se correlaciona bien con los hallazgos de la función de deseabilidad y la selección de la “mezcla 4” como la mejor y más efectiva opción que refleja también diferencias en los compuestos coextraídos.

## 2.4 Método orientado hacia la determinación de OTA en café verde y tostado

La mezcla 4 (MeOH/H<sub>2</sub>O, 1:1) fue la seleccionada para ser evaluada como solvente de extracción en café verde y tostado. Además, dado que en la literatura no existía una instrucción definitiva respecto al uso de solventes acidificados [107] ni este tipo de métodos de limpieza en el café, no sólo se evaluó el efecto de la adición de ácido fórmico, sino también el uso de dos adsorbentes para la limpieza por dSPE. En este caso, se seleccionó el uso de Isolute® ENV+ debido a su alta superficie y retención efectiva junto con la sílica modificada Bondesil® PSA para ejecutar la limpieza por triplicado, sumando 24 muestras

<sup>16</sup> Número de compuestos en diferentes mezclas de extracción significativamente diferentes (valor  $p < 0,05$ ) y al menos un cambio del doble ( $|\log_2 X_i| > 1$ ) en una abundancia mayor o menor de cada compuesto ( $X_i$ ) versus la referencia (Mezcla 4, MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1) comparado entre diferentes tipos de café de la Región San Juan (SJ)

fortificadas a comparar con un nivel correspondiente de OTA a 5 µg/kg para evaluar la recuperación. Las muestras fueron etiquetadas conforme a la clase de granos de café (G: verde, T: tostado), el primer dígito corresponde a la extracción (0: sin ácido, 1: con ácido) y el segundo al adsorbente de limpieza por dSPE (1: PSA, 2: ENV+). El lote se inyectó usando dos métodos de adquisición diferentes. Por un lado, para el método *Full Scan* la resolución se redujo a 17500 FWHM para poder aumentar el número de *scans* por pico, pero también para poder combinarlo con un evento de fragmentación cuyos detalles se encuentran en la sección de métodos instrumentales. Estos últimos parámetros se establecieron con el objetivo de caracterizar los extractos mediante la activación selectiva de eventos MS2 para identificar los compuestos con retención diferencial. Los resultados del análisis de datos se basaron en el flujo de trabajo “Food Research” de Compound Discoverer™ y se resumen en la Tabla 2-2. El flujo de trabajo incluyó análisis estadístico, búsquedas en bases de datos locales (Arita Lab y EFS HRAM ThermoFisher™ Scientific™) y en línea [119], que permitieron la identificación de compuestos endógenos coextraídos [120].

**Tabla 2-2:** Ejemplos de compuestos endógenos de los extractos de café con anotación tentativa<sup>17</sup>.

Compuesto	Rt (min)	MS1			MS2		Análisis diferencial			
		Predicción de Fórmula	SFit (%)	Δ m/m (ppm)	Precursor (m/z)	Match (%)	ID	Contraste	FC	PV
Caffeine	3.595	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	12	0.39	195.1624	71.7	2	NS	<0.5	>0.05
Chlorogenic acid	3.048	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	88	-0.74	356.1716	99.8	2	G02/G01	2.24	0.0072
4,5-dicaffeoylquinic acid	3.860	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	85	1.28	518.1646	97.9	2	NS	<0.5	>0.05
1-caffeoyl-5-feruloylquinic acid	4.173	C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	50	1.32	531.1504	-	3	NS	<0.5	>0.05
3-O-feruloylquinic acid *	3.545	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	89	-0.14	370.1703	97.2	2	T02/T01	-2.11	0.0019
Cyclo(leucylprolyl) **	3.651	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	83	0.47	212.1414	98.2	2	NS	<0.5	>0.05
Trans-5-O-(4-coumaroyl) quinic acid	3.114	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	90	0.1	339.1077	98.9	2	G02/G01 T02/T01	-3.39 -1.96	0.0053 0.026
5-hydroxymethylfurfural	2.815	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	45	3.16	-	-	3	Ninguno, solo en T (Tostado)		

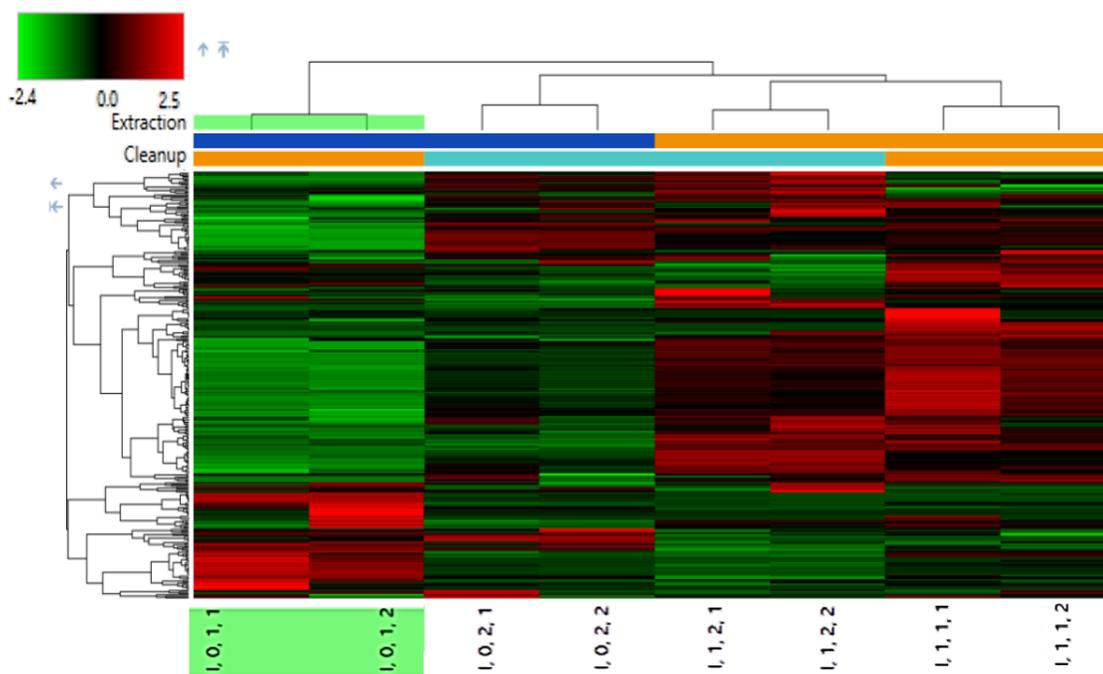
<sup>17</sup> Anotación de *features* mediante fragmentación de MS2 a 25 NCE (FS-DDA/dd-MS2) y resultados de contrastes seleccionados del análisis diferencial. **Rt:** Tiempo de retención, **MS1:** Evento de escaneo completo a 70000 FWHM en polaridad positiva, **MS2:** Evento desencadenado por MS1 para seleccionar el precursor con un aislamiento de 3 m/z para sufrir una disociación inducida por colisión (HCD) de mayor energía a 25 eV y la adquisición del espectro de fragmentación a 35000 FWHM. **Fórmula prevista:** resultado del nodo de predicción basado en la tolerancia de masa y la composición elemental, así como en la coincidencia de patrones isotópicos. **SFit:** puntuación basada en la puntuación de similitud espectral entre el isótopo teórico y el medido. patrón como porcentaje, **Error:** diferencia de masa en ppm entre la masa experimental y la masa anotada, **Precursor:** precursor seleccionado en (m/z) que desencadena el evento MS2, **Coincidencia:** mejor puntuación de coincidencia (0 - 100) de la identidad de mzCloud buscar el compuesto, **ID:** niveles de confianza de anotación basados en el Grupo de Trabajo de Análisis Químico (CAWG) de la Iniciativa de Estándares Metabolómicos (MSI) [164], **NS:** No se encontró evidencia por encima del nivel de significancia del 5%, **FC:** Log<sub>2</sub> *Fold-change*, **PV:** valor p del contraste mediante una prueba t multivariada (suponiendo una varianza igual). \* La información coincidente de MS1 y MS2 puede corresponder al clorogénico metilato, compuesto isobárico. \*\* La información de coincidencia de MS1 y MS2 puede corresponder al ciclo (leucylprolyl), un compuesto isomérico

En el Anexo A, la [Tabla A3](#) muestra ejemplos de espectros experimentales para la anotación tentativa (nivel 3) y la identificación putativa (nivel 2) [121] de polifenoles, como el ácido feruloylquinic y el ácido dicaffeoylquinic que se han reportado en cantidades significativas en la preparación del café [122], aunque también se sabe de una gran diversidad química en relación con la composición de los granos de café [108]. La cantidad de sustancias bioactivas y polifenoles que se extrajeron mediante la versión sin ácido fue significativamente mayor para el uso de ENV+ que para PSA, por ejemplo, en el caso del ácido chlorogenic (café verde), pero significativamente menor, para el ácido feruloylquinic (café tostado) y el ácido *trans*-5-O-(4-cumaroyl) quinic (tanto en el café tostado como en el verde). Con respecto al 5-hydroxymethyl furfural, no hubo diferencias significativas en las áreas relativas, ni por extracción ni por método de limpieza. Vale la pena señalar que este compuesto cuenta con cierto grado de toxicidad, pero solo estuvo presente en el café tostado, como se esperaba [123]. De manera similar, los archivos sin procesar también fueron analizados por el nodo de análisis diferencial para realizar un Análisis de Componentes Principales (PCA). La [Figura A8](#) muestra la varianza acumulada que explica más del 60% de la variabilidad por los componentes principales (PC) 1 y 2. Sin embargo, luego la evaluación se repitió incluyendo una mayor cantidad de muestras de café tostado, e incluyendo también la comparación con extractos crudos. Como se muestra en [la Figura A9](#) (a), se observa una diferencia notable que muestra dos grupos a lo largo del eje x, PC1, lo que explica la mayor parte de la variación total que separa las muestras sin limpieza de las muestras sometidas a cualquiera de las opciones de limpieza en un grupo al lado izquierdo. Por otro lado, el PC4 pudo separar grupos de muestras mediante extracción (c) y limpieza (b). En este punto, se utilizó una adquisición tipo PRM para cuantificar la OTA para lograr una mejor selectividad y poder calcular la recuperación en cada condición. Se obtuvieron recuperaciones más bajas con la extracción acidificada (ENV+: 15%, PSA: 41%) respecto a la extracción no acidificada (ENV+: 37%, PSA: 95%). Según lo anterior, se obtuvieron los mejores resultados con PSA. Adicionalmente, también se consideró realizar un análisis de conglomerados jerárquicos (HCA), empleando métodos de agrupación por distancia euclidiana entre otras posibilidades (Manhattan, Pearson) que realmente dieron resultados idénticos al de la Figura 2-1. El mapa de calor muestra las réplicas de la limpieza con PSA sin acidificar en el rectángulo resaltado lo que corresponde a la única condición en la que se ven intensidades relativamente más bajas de la mayoría de los compuestos (verde en la escala), lo que podría asociarse con una mejor eficiencia

en la etapa de limpieza. De acuerdo con esto, compuestos de diferente naturaleza provenientes de la matriz tienden a adsorberse en mayor medida al PSA, por lo que se obtiene un extracto más limpio. Como esto también se ha reportado para la OTA, aunque en condiciones diferentes [124], el uso de adsorbentes no se consideró para el siguiente paso.

Teniendo en cuenta que el PSA es un adsorbente de intercambio aniónico débil que también podría retener compuestos polares a través de enlaces de hidrógeno, el uso del extracto crudo puede ser la forma más razonable para evitar sesgos al buscar especies más polares que puedan formarse durante tratamientos térmicos como el tueste o el proceso del torrefacto.

**Figura 2-1:** Mapa de calor que muestra la correlación de los compuestos detectados y una muestra de café tostado. <sup>18</sup>



<sup>18</sup> Diseño experimental para la extracción sin ácido (0 y barra superior azul oscuro) y con ácido (1 y barra superior amarilla); y para el factor de tratamiento de limpieza con el adsorbente PSA (1 y barra superior amarilla) y ENV+ (1 y barra superior azul claro). Las réplicas se representan en el código de muestra en el último dígito. El color de cada rectángulo representa la cantidad relativa según la escala roja/verde ubicada en la esquina superior izquierda (z-Score). El dendrograma vertical muestra grupos diferentes de compuestos en relación con zonas de distinto color. El dendrograma horizontal muestra la agrupación frente al nodo aparte de la primera muestra, se resalta la diferencia con el cuadrado verde para una mejor comprensión.

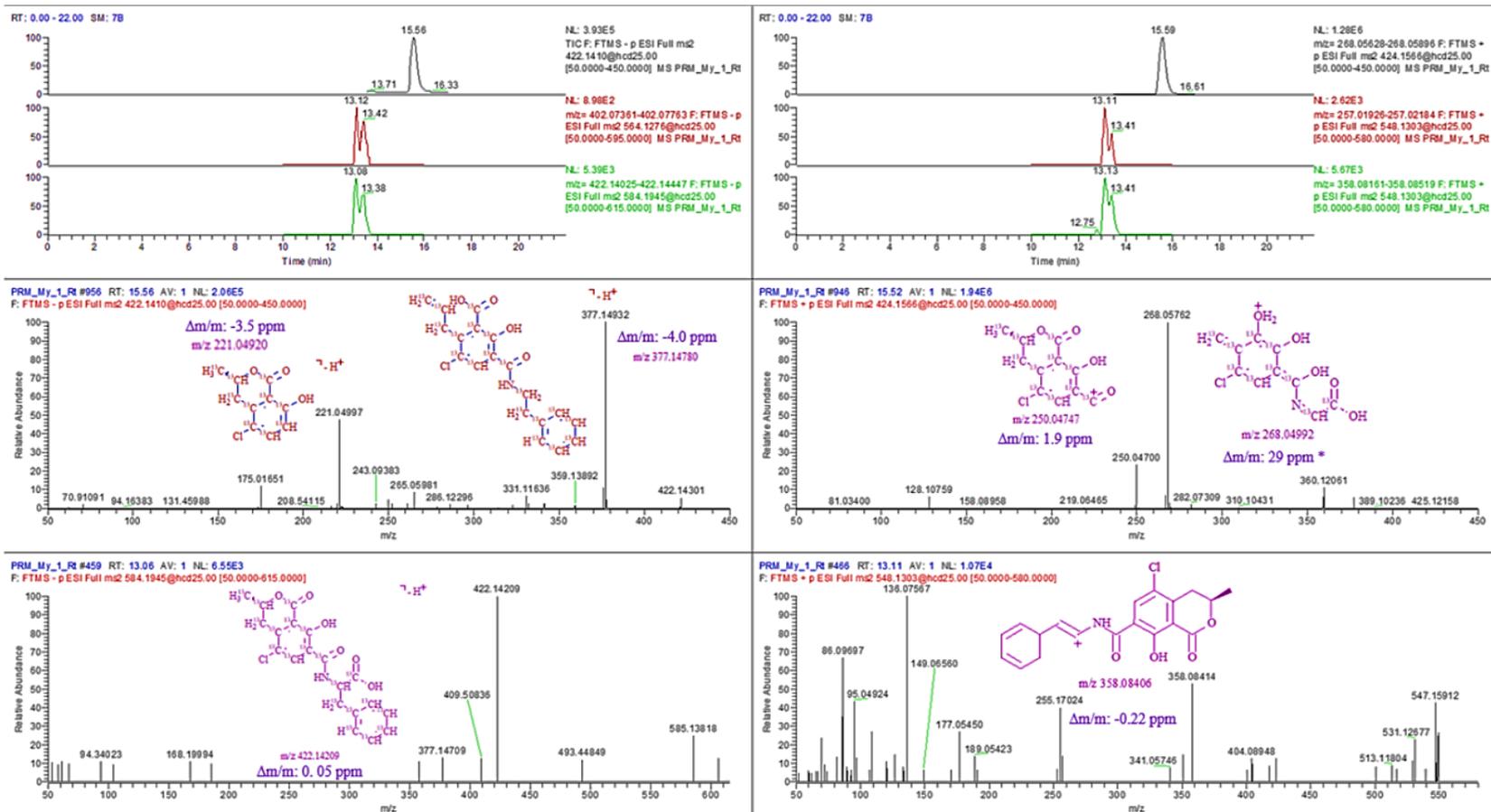


## 2.5 Enmascaramiento de la OTA durante el procesamiento

Bittner estudió por primera vez la formación de ésteres de OTA unidos a la celulosa durante el tostado de café contaminado artificialmente utilizando methyl- $\alpha$ -glucopyranoside [56]. En el presente estudio, un compuesto alifático (D (-) -sorbitol), un polifenol aromático (galic acid) y un compuesto similar al del trabajo mencionado (D (+) -glucono-1,5-lactone) se utilizaron como moléculas modelo para probar la capacidad de diferentes compuestos polihidroxilados para conjugar OTA en un proceso de tratamiento térmico. Se realizó un análisis mediante reconocimiento de patrones isotópicos con el módulo TracExtract que reveló iones precursores de OTA (con y sin marcar) alrededor de 14,39 a 14,41 min para todos los ensayos. Sin embargo, la [Figura A10](#) del Anexo A muestra una condensación de OTA con metanol (parte del medio de disolución) y su *feature pair* marcado que está separado por 20 carbonos ( $X_n: 20$ ) dentro de la tolerancia al error de masa ( $\Delta m/m < 5$  ppm) a  $m/z$ : 438,17174. Por otro lado, surgió una situación interesante que demuestra una conjugación con isómeros de los grupos hidroxilo primarios en ambos extremos del D (-) -sorbitol que produjo dos picos con espectros idénticos a 12,13 y 13,35 min como parte de una reacción regioselectiva que da lugar a las dos especies. Los picos indicaron *feature pairs* nativos y marcados de iones tanto positivos como negativos, mostrados en la [Figura A11](#) (a). El *feature group* de los ésteres de  $^{12}\text{C}$ -OTA nativa y de  $^{13}\text{C}$ -OTA marcada también se correlacionan con los aductos de sodio a  $m/z$  590,13995 y 610,20654, respectivamente. De manera similar, la [Figura A12](#) indica que ambos grupos hidroxilo en posiciones m y p pueden reaccionar con el grupo acilo dando la posibilidad de formar los dos isómeros diferentes del galic acid, encontrados a 16,12 y 17,01 min, ambos caracterizados por los isotopólogos  $m/z$ : 556,09869 y 576,16748. Asimismo, la formación del acilglucósido con la D (+)-glucono-1,5-lactone puede tener lugar en diferentes posiciones de este compuesto cíclico. Podría decirse que puede darse una preferencia por reaccionar con la posición del hidroxilo en C6 ( $\text{C}_{22} \rightarrow \text{C}_{6'}$ ), ya que tiene menos impedimento estérico y podría corresponder al pico más alto a los 13,23 min en la [Figura A13](#). Finalmente, conforme a la dinámica anterior se revisó en la [Figura A14](#) los valores esperados del producto de condensación entre la sacarosa y la OTA, pero resulta no haber evidencia de pares nativos y marcados. Sin embargo, se detectó un *feature group* a los 12,04 min en modo negativo. Este último par coincide con la conjugación con una unidad de glucosa (OTA-glu), un

producto ya descrito [125] que presumiblemente se ha derivado de la descomposición del disacárido durante la exposición térmica. Los iones prominentes a  $m/z$ : 564,12665 y 584,19464 tienen estrecha relación con hallazgos previos que reflejan la formación del acilglucósido pero a partir de celulosa, aunque aquí no se encontró evidencia de unión con el residuo de fructosa. Sabiendo que la potencial formación de conjugados de OTA durante el proceso de torrefacto difiere del experimento de unión a la matriz (*matrix binding*) que se realizó con celulosa en estudios anteriores, la presencia del conjugado OTA-glu es un factor común en ambos casos. La adición de azúcar a una temperatura entre 150 y 200 °C en la última fase del proceso de tostado se ha descrito en la literatura [126], por lo tanto, el siguiente paso consistió en agregar al grano la mezcla de OTA nativa/marcada y una solución de sacarosa, luego se dejó secar la superficie al aire y se calentó a 150 °C durante 5 min. En este caso la matriz de café se utilizó para simular la adición de azúcar que se realiza en la industria desde los primeros procesos industriales patentados ES28829A1 y ES39494A1 [127, 128], práctica que todavía está permitida por la normativa vigente con un contenido de azúcar de hasta el 15% (p/p) en producto torrefacto, vendido sólo en unos pocos países como España y Argentina [129]. En vista de esta situación donde la matriz resulta mucho más compleja, se hizo uso del Método de adquisición 2 para poder resolver posibles interferencias en la matriz de café mediante la selección de los iones precursores ya identificados en el experimento modelo. La Figura 2-2 muestra el TIC en ambas polaridades de los iones producto de  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -OTA. Los tiempos de retención cambiaron ligeramente debido a la composición de la matriz, ya que se identificaron a los 15,56 min y 15,59 min con sus espectros en ambas polaridades en la celda de la mitad. Del mismo modo, las posiciones de los precursores de los glucósidos previamente identificados se movieron un poco, y los picos dobles de los precursores nativos y marcados quedaron alrededor de 13,11 min mostrando una elución coaxial y con la misma forma de pico. La celda de la izquierda en la parte inferior muestra los fragmentos marcados seleccionados del acilglucósido ( $m/z$ : 564,1276) en modo negativo, mientras que el espectro de la parte inferior derecha muestra fragmentos típicos de la OTA nativa ( $m/z$ : 358,08340 y 257,02078) ya que es parte de la unidad del acilglucósido ( $m/z$ : 548,1303) detectado en modo positivo. Esta unidad está relacionada con la deshidratación del OTA-glu original ( $m/z$ : 566.14236), detectada en modo negativo. Todos los errores de masa de los fragmentos estuvieron por debajo de 5 ppm en ambas polaridades, excepto la estructura propuesta para el  $^{13}\text{C}$ -OTA marcado (\*) que corresponde a la masa extraída a  $m/z$ : 268,05762 (28,7 ppm), aunque su pico si se superpone completamente a 15,03 min, ubicado en la parte superior del panel.

**Figura 2-2:** Café contaminado artificialmente con <sup>13</sup>C-OTA nativo, marcado y sacarosa agregada, luego sometido a procesamiento térmico a 175 °C por 5 min.<sup>19</sup>



<sup>19</sup> El material se extrajo usando la Mezcla 4 MeOH/H<sub>2</sub>O (1 :1) y se analizó directamente mediante HRMS en modo de adquisición PRM (Método 2). a) Primera celda, de arriba a abajo: TIC en negro que muestra el precursor de OTA en la celda de la mitad al tiempo de retención correcto. EIC negativos en rojo y verde para los productos iónicos estructuralmente relacionados de los precursores seleccionados que están relacionados con el acilglucósido (OTA-glu) para la unidad nativa (m/z: 564, 1276) y marcada (m/z: 584, 1945). b) Polaridad positiva. EIC en negro para el pico base m/z: 268,05759. Aunque el error de masa es inaceptable para una estructura potencial (\*), la misma forma y tiempo de retención es un buen indicador para un fragmento verdaderamente relacionado con la unidad <sup>13</sup>C-OTA. Trazas EIC en rojo y verde de fragmentos típicos en espectros de OTA originados a partir del precursor OTA-glu (m/z: 548, 1303).

Para estudiar el efecto de la temperatura sobre el enmascaramiento hipotético de la OTA durante el proceso de torrefacto, el experimento de calentamiento se llevó a cabo a diferentes temperaturas que oscilaron entre 150 °C y 250 °C. En resumen, se adicionó una solución de disacárido a la matriz de café contaminada artificialmente y se sometió a calentamiento a 150, 175, 200, 225 y 250 °C durante el mismo período en experimentos separados. Las muestras se retiraron rápidamente del calor y cuando ya estaban frías se procedió a la extracción y análisis por LC-HRMS. Posiblemente el modo de adquisición más sensible en la tecnología Orbitrap es el llamado monitoreo individual de iones (SIM<sup>20</sup>), que funciona de la misma manera que el evento *Full Scan* del Método 1, pero los lentes electrostáticos y otros elementos están configurados en modo de transmisión para evitar la pérdida de iones que pueden disminuir la intensidad de la señal. Por lo tanto, el rango de las masas seleccionadas se redujo a 1 Da para mantener la C-trap llena con la menor cantidad posible de iones de interferencia, maximizando así la población de iones de interés en la configuración AGC de 1 millón de cargas a inyectarse en el Orbitrap. La [Figura A15](#) muestra los EIC de la OTA nativa y marcada (filas 1-4) y las trazas de los iones de acilglucósidos nativos y marcados en ambas polaridades (filas 5-7). Con relación a la OTA, en la parte superior el EIC a los 15,5-15,7 min se ve una dependencia de la señal con relación a cada aumento de 25 °C que condujo al siguiente comportamiento: una caída del 50 % a 175 °C, otra caída del 60 % a 200 °C seguido de una nueva caída del 90% a 225°C de OTA, es decir, en total sólo un acumulado del 2% de la cantidad inicial que finalmente desaparece por completo a 250°C, de manera similar a lo encontrado en otros estudios [64]. Por el contrario, no se encontraron variaciones significativas desde 150 a 175 °C con respecto a las formas modificadas de OTA. Sin embargo, por encima de 200 °C no quedaron picos visibles de ninguna de las trazas de los glucósidos. De hecho, esto podría explicarse debido a que la sacarosa tiene un punto de descomposición a 185 °C, lo que limita cualquier posibilidad de conjugación a temperaturas más altas.

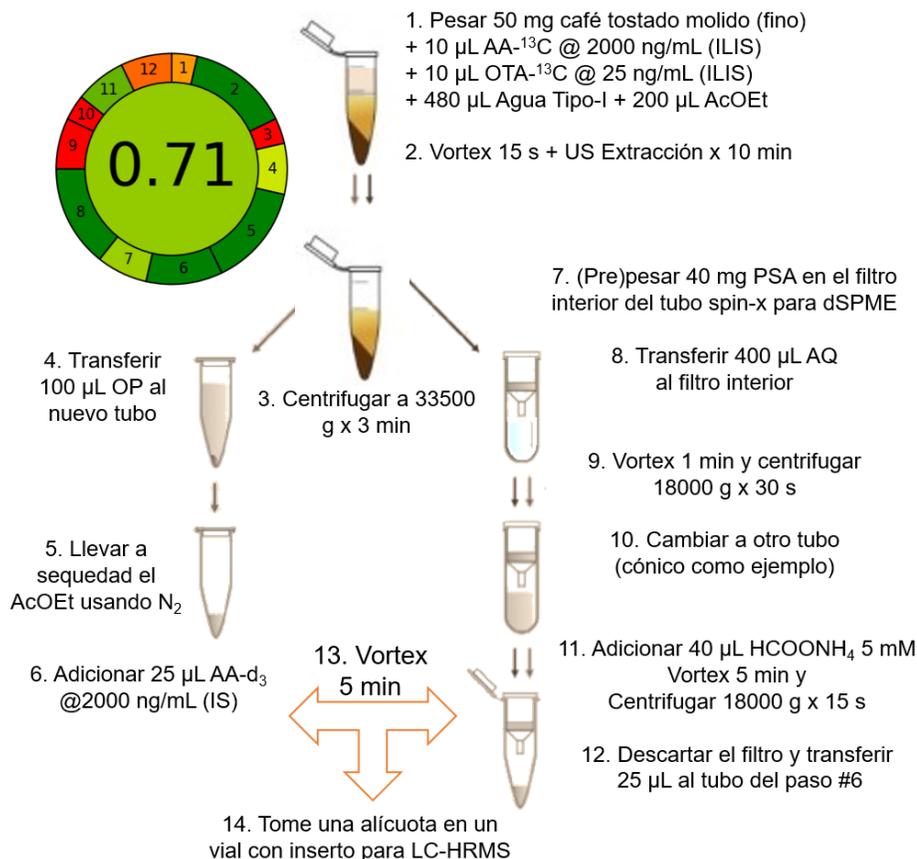
---

<sup>20</sup> *Single Ion Monitoring*

### **3. Capítulo 3: Integración de analitos clave y ampliación del alcance**

Con el fin de incluir en el alcance del método contaminantes relevantes en el café, se consideró determinar la AA en el café tostado en un procedimiento separado representado en la Figura 3-1. Los pasos de este método de preparación de muestras se explican a continuación. Se pesan 50 mg de café molido tostado en un tubo de PP, luego se agregan 10 mL de AA-<sup>13</sup>C a 2000 ng/mL y 10 mL de OTA-<sup>13</sup>C a 25 ng/mL usado como ILIS para la cuantificación. Se agregan 480 µL de agua de grado tipo I y 200 µL de AcOEt, se cierra la tapa firmemente y se agita manualmente para distribuir de manera uniforme antes de usar un vórtex durante 15 s, para finalmente colocar el tubo en un baño ultrasónico (US) durante 10 min. La mezcla se centrifuga a 33500 g durante 3 min a 4°C. Una separación de fases se hace visible cuando termina la centrifugación, luego se transfieren 100 µL de la fase orgánica superior (OP) en un tubo de PP nuevo y se deja secar usando una corriente suave de nitrógeno bajo la campana de extracción. Una vez el residuo está completamente seco, se agregan 10 µL de AA-d<sub>3</sub> a 2000 ng/mL (IS) y se reserva el tubo para su uso posterior. Respecto a la fase inferior de la separación (acuosa), se toman 400 µL evitando que entren residuos de solvente orgánico. Se transfiere la alícuota sobre 40 mg de Bondesil® PSA pesado previamente en el filtro Spin-X® para la microextracción en fase sólida tipo dispersiva “en tubo” (dSPME). Se tapa y se agita por 1 min, luego se centrifuga a 18000 g por 30 s a 4°C. Se destapa el tubo Spin-X® y se transfiere el filtro a un tubo de PP nuevo (tubo cónico nuevo). Se añaden 40 µL de formiato de amonio 5 mM sobre el adsorbente, se agita por 5 min y luego se centrifuga por 18000 g por 15 s a 4°C. Se transfieren 25 µL al tubo que había sido reservado. Se agita por 5 min asegurándose de que el contenido se mueva por las paredes del tubo. Finalmente, se toma una porción de más de 40 µL en un inserto para inyectar en LC-HRMS utilizando el método de adquisición 3.

**Figura 3-1:** Esquema para la determinación de AA y OTA mediante microextracción sólida dispersiva 'en tubo' (dSPME).<sup>21</sup>



Por último, se consideró como una posibilidad interesante poder incluir plaguicidas y otras micotoxinas para ampliar el alcance del método. Por esta razón, el método descrito para el café tostado fue modificado en tres aspectos: fortificación, preparación de los inyectables y la adición de un “Programa Definido por el Usuario” (UDP) para la inyección automática. En primer lugar, el esquema de fortificación incluyó: una mezcla de aflatoxinas B1/2 y G1/2, y una solución de trabajo con aproximadamente 700 compuestos a 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  con fines de validación. Además, se usó atrazina- $\text{d}_5$  como compuesto subrogado a una concentración fija de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En segundo lugar, no se realiza el paso 13 de la preparación de la muestra en la Figura 3-1 y tanto la fase acuosa como la orgánica se inyectan en viales separados como se explica a continuación.

<sup>21</sup> AA: Acrylamide, OTA: Ochratoxin A, EtOAc: Acetato de etilo, US: Ultrasonido, PSA: Sorbente modificado con amina secundaria primaria, OP: Fase orgánica, AQ: Fase acuosa. Métrica analítica *green chemistry* (AGREE) : 0,71, según los 12 principios de la química verde [165].

Por un lado, se agregan 50  $\mu\text{L}$  de ACN después del paso 5 al tubo de PP seco y se agita durante 1 min, luego se transfiere una porción mayor a 40  $\mu\text{L}$  a un inserto identificado como “OP” para la fase orgánica y se coloca en la bandeja de muestras del LC-HRMS. Por otro lado, se toman 25  $\mu\text{L}$  del tubo de PP en el paso 12 y se coloca aparte en otro vial con inserto con 25  $\mu\text{L}$  con formiato de amonio 5 mM, preferiblemente etiquetado con el identificador “AQ”, o fase acuosa. Luego, los dos viales se colocan en posiciones adyacentes en el muestreador automático para realizar la rutina de inyección UDP, que incluye una inyección tipo sándwich del estándar interno triphenylphosphate (TPP) con la muestra AQ para dar inicio a la adquisición, seguida de la inyección de la muestra orgánica OP. Este procedimiento es más completo y fue el método sometido a validación.

### 3.1 Integración de métodos individuales

A pesar de que la determinación de AA siga siendo un desafío por su carácter polar el coleo del pico en la [Figura A16](#) (a) muestra una mejora con respecto al pico partido (cuadrado ampliado), al incluir un *loop* de un volumen grande entre el automuestreador y la cabeza de la columna. Esta es una alternativa sencilla al modo de “*feedthrough*” que recientemente se ha incluido en los últimos modelos de muestreadores automáticos con el objetivo de corregir la forma de los picos de los plaguicidas más polares. Ahora, con respecto al espectrómetro, aunque se usó una resolución nominal de 70000 FWHM @ 200 m/z, la resolución real al m/z de la AA y sus isotopólogos resultó llegar hasta casi 130000 FWHM aumentando la selectividad del sistema a estas moléculas. Sin embargo, esta situación puede traer consecuencias, puesto que la posibilidad de perder el pico de la ventana de extracción de masa en caso de que haya un ligero sesgo en la calibración podría derivar en un problema si la frecuencia de calibración en una secuencia de inyección se ve comprometida. Por lo tanto, la lista de inclusión del método de adquisición PRM (Método 3) se actualizó con transiciones específicas para AA,  $^{13}\text{C}$ -AA y AA- $\text{d}_3$  en la [Figura A16](#) (b) para tener más seguridad en caso de una caída en la exactitud de los valores m/z. Al usar una fase estacionaria C18 capaz de resistir 100% de fase acuosa, fue posible hacer que la AA eluya en 1 min, pero evitando la presencia de solvente que puede dañar la forma del pico. Es cierto que este tiempo de retención ( $R_t$ ) puede parecer demasiado corto, pero no está tan lejos del  $R_t$  en los métodos oficiales, donde la retención también es muy poca a pesar de que se usen fases estacionarias basadas en carbón, donde la AA eluye normalmente alrededor de 4 min, pero que igual puede desplazarse hasta 1,5 min después

de varias inyecciones. Sin embargo, al inyectar niveles preparados en matriz, el  $R_t$  permanecía estable a 1,7 min ([Figura A17](#)) cerca al límite obligatorio del  $R_t$  según la norma ISO 16618:2015 [130]. Ahora bien, teniendo en cuenta que la mayoría de los métodos utilizan una extracción acuosa seguida de SPE (p. e.: Oasis MCX, Isolute® ENV+), se realizaron pruebas utilizando el adsorbente ENV+, pero también PSA. El PSA es un adsorbente de intercambio de aniones débil, con un  $pK_a$  de aproximadamente 10,1 y 10,9. La selección del adsorbente PSA tiene que ver con un beneficio adicional que puede ser aprovechado, la elución acuosa puede descartar la necesidad de la etapa de evaporación de MeOH que la mayoría de los métodos requieren, debido principalmente al cambio de solvente que resulta obligatorio antes de la inyección. Además de usar MeOH con ENV+, se probaron dos soluciones *buffer* para elución del PSA, con el objetivo de evaluar su eficacia. Aunque el adsorbente ENV+ exhibe una superficie polimérica no polar hidroxilada que requiere MeOH para la desorción, la selección de los *buffers* se basó en la presencia de las aminas ionizadas en la superficie (a  $pH < 8$ ) y el mecanismo de enlaces de hidrógeno inducidos sobre la superficie y la estructura polar de la AA, que eventualmente podría ser desplazada a través de un mecanismo competitivo electrostático. Por lo tanto, se usó carbonato de amonio y formiato de amonio a 5 mM para probar en qué medida los grupos carboxilato son capaces de establecer una compensación de carga en la superficie del PSA, liberando así la AA a la solución. Los experimentos mostraron una retención diferencial entre las pruebas. Se realizó un ANOVA simple para evaluar un diseño completamente al azar seguido de una prueba de comparación de medias basada en la denominada "diferencia honestamente significativa" (HSD) de Tukey para comparaciones múltiples entre los diferentes sistemas carbonato/PSA, formiato /PSA y MeOH/ENV+. El sistema carbonato/PSA tuvo una capacidad de elución de una cantidad significativamente inferior de AA que los otros sistemas evaluados ( $p < 0,05$ ), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los sistemas formiato/PSA y MeOH/ENV+ ( $p = 0,5881$ ). Dada esta situación, el formiato de amonio se seleccionó como solución elegida para la elución del PSA, ya que funciona de manera similar al sistema clásico, pero cuenta con el beneficio de ser una alternativa más rápida y ecológica ya que permite eluir la AA empleando una solución acuosa. Con relación al esquema del método de la Figura 3-1, con el uso de la metodología dSPME hay evidencia de una retención simple, no exhaustiva, pero efectiva de la AA. Durante este paso se agita fuertemente para promover la eficiencia del proceso de microextracción a través de las partículas suspendidas de PSA que adsorben la AA. A este respecto, se realizó un estudio del tiempo necesario para alcanzar

el equilibrio como se muestra en la [Figura A17](#) (a y b). Se realizó la adición de AA-d<sub>3</sub> después de la extracción para corregir el área de la AA y la AA-<sup>13</sup>C frente al tiempo en los experimentos de adsorción con una duración de hasta 20 min en la [Figura A17](#) (c). Como se puede observar, el valor permanece casi constante a lo largo del tiempo, aunque es más fácil de visualizar utilizando el Log<sub>10</sub> del tiempo, [Figura A17](#) (d). Estos resultados permitieron seleccionar 1 min como tiempo de contacto suficiente para la adsorción asistida por vortex. Adicionalmente, es necesario tener en cuenta que la cantidad de adsorbente realmente está limitada por el tamaño del filtro Spin-X®; por lo tanto, la cantidad de PSA utilizada también se probó (50, 100 y 150) mg, pero se seleccionó la cantidad más baja ya que no hubo cambios en la recuperación en las otras cantidades como se muestra en la [Figura A18](#) del Anexo A. Por otro lado, como el café es una matriz con un contenido significativo en lípidos que está cercano a 10% p/p, la fase orgánica para la extracción de la OTA también contiene grasas y aceites. El AcOEt se ha utilizado para la extracción de micotoxinas [131] con la ventaja de permitir la separación física casi inmediata de los sistemas al ser un solvente bastante inmiscible, a diferencia de otros.

En resumen, el método consiste en una miniextracción sólido-líquido utilizando solventes no miscibles (AcOEt y H<sub>2</sub>O), de donde se retiran ambas fases de los sólidos restantes y se pasa hacia dos procedimientos separados. Por un lado, la retención de la AA por dSPME 'en tubo' y su elución tipo acuosa, y por el otro, la obtención de un residuo seco del extracto orgánico donde se encuentra la OTA, para finalmente combinarse ambas partes para su análisis instrumental. Ahora, en lugar de comparar directamente este procedimiento con cada uno de los métodos oficiales, se calculó una métrica general para dar una idea del carácter "verde" del método siguiendo la métrica *Analytical Greenness* (AGREE) que incluye los 12 principios de la *green chemistry* o química verde [132]. Esta estimación hace uso de una ponderación para los factores relevantes en cada contexto, por ejemplo, se utilizó un peso mayor para los siguientes principios: tamaño de muestra y número de muestras en el lote (# 2), la selección de métodos automatizados y miniaturizados (# 5), se debe evitar la derivatización (# 6) y también que se prefieren los métodos de múltiples analitos a los métodos que utilizan un analito a la vez (# 8). Por otro lado, se le asignó menor importancia a aspectos que no son comparables dentro del tipo de métodos de esta aplicación como: técnicas directas para evitar el tratamiento de la muestra (#1), las mediciones *in situ* que son más comunes en los métodos de análisis ambiental (#3), y, que se deben preferir los reactivos renovables (# 9) ya que lamentablemente ninguno de los

reactivos proviene de fuentes biológicas. Para el resto de los principios se utilizó el peso predeterminado y la puntuación final sumó 0,71 (Figura 3-1), que está lejos del máximo ideal, pero coincide con el conjunto de esfuerzos desplegados para acercarnos de cierta manera a una iniciativa más ecológica. Además, cabe resaltar que es una ventaja que no sea necesario secar metanol, ya que requiere mucho tiempo, como ocurre en el método oficial. Otra ventaja es que se requiere una sola inyección con el Método 3 tipo PRM, que brinda información que antes solo estaba disponible mediante el uso de diferentes métodos tipo SRM y, por lo tanto, también contribuye como una ventaja para la cuantificación de otros contaminantes. Gracias a la miniaturización, se hace posible usar poca cantidad de masa de ILIS para la AA y la OTA en las fortificaciones, para así lograr una adecuada corrección por recuperación y corregir fuertes efectos de matriz esperados en muestras de café tostado. Una vez que los SRM se consolidaron en el nuevo método, se realizó una prueba de “resistencia”. La [Figura A19](#) muestra las áreas y el tiempo de retención de 100 inyecciones, donde sólo después de unas 50 inyecciones consecutivas el rendimiento comenzó a caer rápidamente para la AA.

Así mismo, fue necesario probar que la representatividad del tamaño de la muestra era adecuada mediante la ejecución de análisis ítems de ensayos de aptitud o PT adquiridos de las rondas del programa de pruebas de competencia en química de alimentos de FAPAS® con muestras de café molido e instantáneo. La distribución de los z-scores calculados tuvieron un ligero sesgo en los resultados de la OTA, aunque la mayoría de los resultados quedaron en el rango satisfactorio. Teniendo en cuenta que la toma de la muestra tiene un impacto alto en la variabilidad del análisis [133], la evaluación de la homogeneidad del material es clave, aunque ya se han reportado buenos resultados con pequeñas cantidades, incluso < 1 g (p. e.: 100 - 500 mg [134–136]). Se utilizó un diseño anidado de dos niveles que incluyó lotes (S) para evaluar la homogeneidad entre unidades y submuestras (A-L) para la homogeneidad dentro de las unidades. No obstante, en la evaluación de los lotes del estudio de OTA se observó una distribución bimodal aparente. La [Figura A20](#) (a) muestra un histograma de valores generados artificialmente al realizar un *bootstrap* (1000) de cada lote donde los límites de confianza de las distribuciones S1 y S3 no se superponen con S2, lo que indica que los lotes pueden diferir verdaderamente, es decir, más allá de la dispersión experimental. Asimismo, la prueba de Tukey indicó diferencias significativas en los grupos a y b de la OTA en la [Figura A20](#) (b), sin embargo, en los diagramas de caja individuales (c), las muestras pertenecen a grupos indistintos

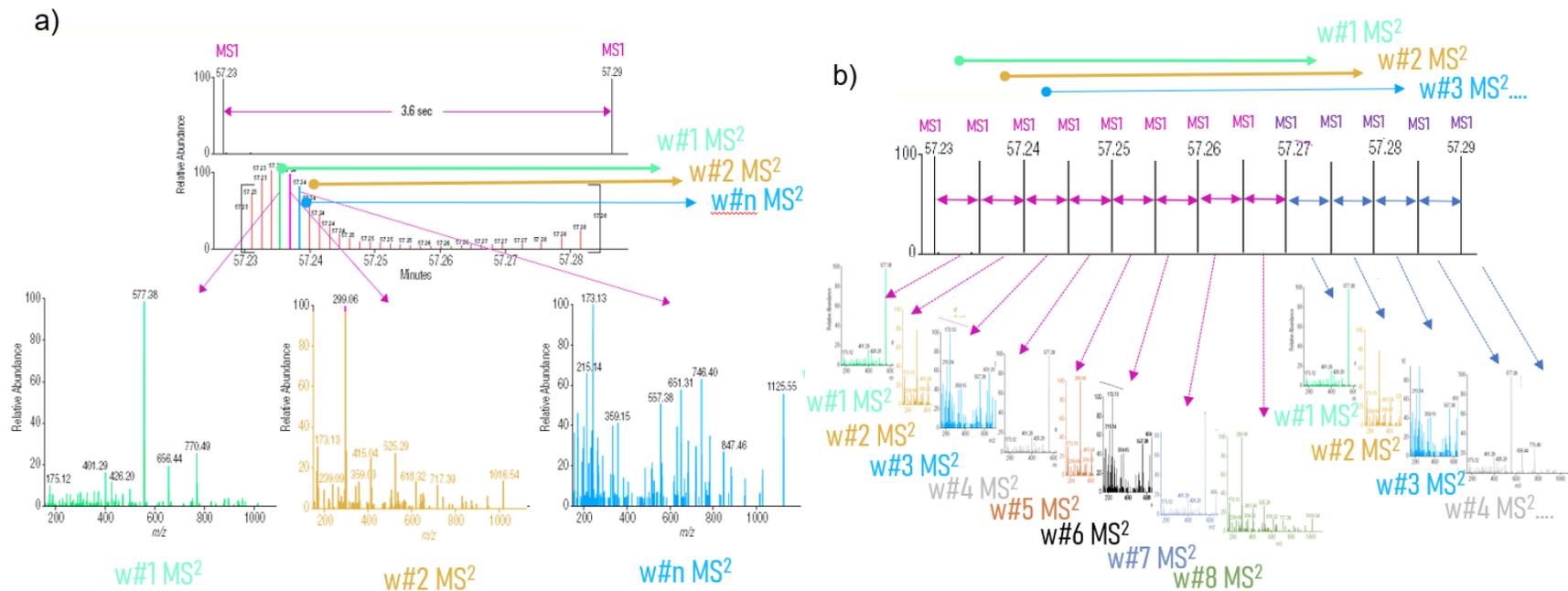
independientemente del lote, excepto E y G del mismo lote S2, donde ambos están situados en el extremo del primer cuartil del mismo lote. En este tipo de diseños siempre se suele hablar de la variación entre las botellas, que aquí son las submuestras, es generalmente calculada usando la expresión  $S_{bu}^2$  en la [Tabla A4](#). Para este análisis se tienen en cuenta varios supuestos: los datos son homocedásticos, normales, aleatorios e independientes en submuestras [137]. De los valores en la tabla se puede observar que se cumple la expresión  $S_{bu} < 0,3 \cdot \sigma_P$ , tanto para AA como para OTA, y por esta razón se considera que se trata de un material adecuadamente homogéneo. Esto debido a que la homogeneidad entre unidades indicaría que cada 50 mg de muestra tiene el mismo valor de cada propiedad. Es cierto que algunos materiales son inherentemente más propensos a la falta de homogeneidad; sin embargo, en el caso del café tostado e instantáneo, es fácil lograr un tamaño de partícula muy pequeño, lo que permite tomar cantidades tan pequeñas, quizás gracias a la fragilidad característica de este tipo de material.

## 3.2 Ampliación del alcance

Con base en lo discutido hasta el momento, el procedimiento descrito se configura como un método multipropósito para café que tiene el objetivo de entregar una idea de la contaminación en el café tostado mediante un solo método. Por un lado, aprovecha el poder de LC-HRMS que permite la detección concomitante de la OTA y la AA con alta selectividad en los niveles requeridos; sin embargo, con el objetivo de ampliar aún más el alcance, se modificó el esquema de la Figura 3-1 mediante el uso de una pequeña modificación del procedimiento descrito en la sección de preparación de muestras, y el método de adquisición en el instrumento el cual se cambió por el FS-wPRM (Método 4) con el objetivo de poder hacer frente a un alcance más amplio mediante el uso del modo MS1, FS o *Full Scan* junto con la posibilidad de confirmación a través de eventos MS2 de una manera "amigable" que evita causar un fuerte impacto en el ciclo de tiempo para la cuantificación. En el Anexo A, la [Figura A21](#) (a) muestra la pestaña de Configuración del experimento con todas las configuraciones importantes en la barra lateral para los cuadros Full MS (MS1) y PRM (MS2). Además, una lista de inclusión elaborada empleando un esquema de ventanas amplias se pueden desplazar en segmentos de tiempo como se muestra en la ventana flotante. Asimismo, el diagrama de dispersión en la [Figura A21](#) (b) muestra la distribución de la masa molecular del ion precursor ( $m/z$ ) y de manera ilustrativa el tiempo de retención de cada compuesto (punto y nombre). Esta matriz de puntos resulta

ser una multitud de puntos con los nombres de compuestos difíciles de distinguir a simple vista, pero lo importante es entender el hecho de que las ventanas rojas se van desplazando a través del tiempo hacia valores  $m/z$  más altos para cubrir otros sectores. Este concepto asegura que la mayoría de los compuestos disponibles para análisis (es decir, los incluidos en los recuadros) pueden experimentar fragmentación y así poder obtener su información MS2, ajustando el rango de cobertura de una manera similar a las ventanas deslizantes que ayudan a mejorar la selectividad en la técnica de movilidad iónica [78]. Sin embargo, vale la pena resaltar que el ancho de las ventanas se seleccionó cuidadosamente para mantener la menor cantidad de eventos PRM con el fin de causar el menor impacto sobre la cuantificación y al mismo tiempo obtener suficientes puntos de datos para definir los picos para su confirmación. Históricamente, cuando se trabaja en el modo de adquisición DIA, el ciclo de trabajo se ve gravemente afectado por la cantidad de ventanas MS2 ya que retrasan la adquisición de un nuevo evento MS1, como se muestra esquemáticamente en la Figura 3-2 (a). Esta situación no ocurre en la configuración propuesta en el método 4 o FS-wPRM, un novedoso modo de adquisición que permite adquirir eventos MS1 entre eventos MS2, lo que lleva a poder obtener una velocidad de adquisición mucho más alta como se esquematiza en la Figura 3-2 (b). De este modo, esta configuración mejora la sensibilidad para la cuantificación, al dejar espacio para 8 ventanas PRM de 25  $m/z$ , que son más estrechas y, por lo tanto, más selectivas que las de 50  $m/z$  de ancho que es lo mínimo que se puede establecer en el modo DIA.

**Figura 3-2:** Representación esquemática de los modos de adquisición en LC-HRMS en Full Scan (MS1) y fragmentación (MS2) de segmentos preseleccionados.<sup>22</sup>



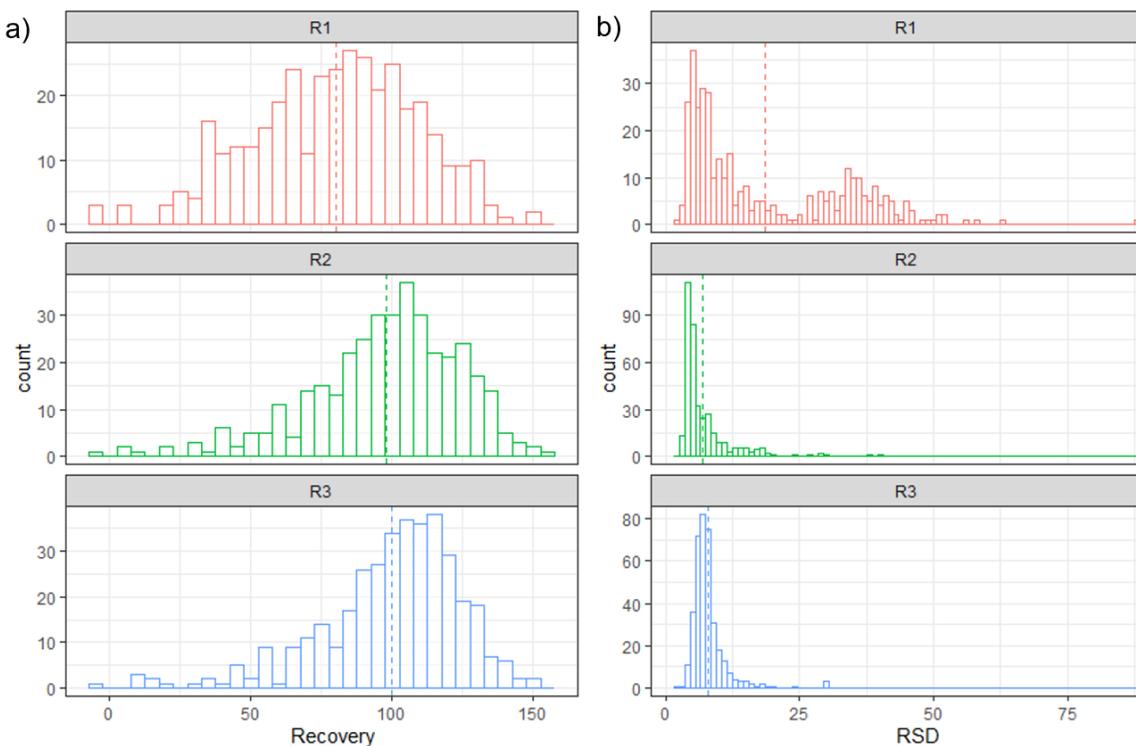
<sup>22</sup> (a) El reconocido modo de Adquisición Independiente de Datos (DIA) en combinación con *Full Scan* crea eventos consecutivos de fragmentación de iones segmentados y de ancho definido para completar el ciclo de trabajo y, solo entonces, se vuelve a adquirir una nueva adquisición de MS1. (b) Un nuevo enfoque que combina el evento de *Full Scan* con un monitoreo "amplio" de reacción paralela (FS- wPRM ) que de manera contraintuitiva permite la adquisición de espectros MS2 con selectividad comparable (ancho de 25 m/z) pero con el beneficio adicional de adquirir espectros MS1. El modo FS- wPRM mantiene una velocidad de adquisición MS2 adecuada para una confirmación cualitativa (flechas superiores de colores), lo que a su vez, acelera la velocidad de adquisición de MS1 mejorando la sensibilidad.

Además de las ventajas del modo de adquisición FS-wPRM, el método tiene la capacidad de realizar inyecciones automáticas de los viales AQ y OP que se alistan por separado para colocarlos en la bandeja del automuestreador. En ensayos preliminares se intentó hacer la inyección *in-needle* que combina sucesivamente los contenidos de ambos viales, pero resultó ser inadecuada puesto que afecta negativamente la cromatografía como se muestra en la [Figura A22](#) (a y b) con los resultados de esta inyección tipo “sándwich” empleando diferente orden entre AQ y OP. La situación radica en que al parecer hay una combinación parcial de las fases (a pesar de que se dejó un espacio de aire) y esto conduce a la distorsión de la forma del pico de la AA debido a la alícuota de composición orgánica. No obstante, posteriormente si se pudo obtener un cromatograma sin distorsiones como se muestra en la [Figura A22](#) (c), empleando una inyección *split* (independiente) que hizo posible realizar la adquisición conjunta de estos extractos, en principio incompatibles, para así aprovechar al máximo el tiempo de funcionamiento del instrumento. Finalmente, la validación se llevó a cabo con la última versión del método 4 para el análisis de muestras que engloba la evaluación de la AA, la OTA y además 512 compuestos adicionales de aproximadamente los 700 utilizados en las pruebas de recuperación, teniendo en cuenta que sólo algunos de la totalidad de estos compuestos pueden ser ionizados eficientemente en las condiciones operativas de la sonda HESI. Es así como fueron sólo 414 de 512 compuestos evaluados los que realmente quedaron incluidos en la validación ya que el resto de los compuestos no presentaron un buen desempeño a los niveles requeridos. Se establecieron criterios de identificación de especificidad y selectividad para todos los compuestos analizados según los criterios de confirmación (MS2), aunque en algunos casos se tendría que requerir una verificación y optimización de la energía de colisión, es decir, que es necesario verificar la identidad (*Check ID*). Por otro lado, otros compuestos fueron etiquetados como "*Quantified only*" cuando se hizo la integración de un pico con un MEW < 5 ppm a partir de la adquisición MS1, pero no se tuvo información de fragmentación disponible. Adicionalmente, el *match* con el patrón isotópico de cada compuesto también fue útil para la identificación ya que se obtuvieron los siguientes valores en promedio: 67,9% a 20 µg/kg, 60,2 % a 10 µg/kg y 47,8 % a 5 µg/kg. La [Tabla A5](#) muestra un resumen de varios parámetros y detalles incluidos en el plan de validación. Las curvas de calibración se basaron en un modelo de regresión ponderada (1/x) basado en curvas de calibración de seis puntos por triplicado al día utilizando el método de mínimos cuadrados. La linealidad se evaluó mediante verificación visual de la gráfica de residuales de las relaciones de respuesta (contra el IS o el ILIS

correspondiente) vs. los niveles de concentración respectivos donde las diferencias del cálculo (*backcalculated*) fueron aceptables  $\leq \pm 20\%$ . Se estableció un  $R^2 > 0,990$  como criterio para la aceptabilidad de la curva de calibración, así como ya se ha establecido también en otros estudios que han utilizado el mismo tipo de tecnología en aplicaciones relacionadas [138]. La precisión y la veracidad se evaluaron a partir de análisis repetidos de muestras de café en blanco fortificadas. La precisión se evaluó calculando la desviación estándar relativa intermedia (análisis repetidos en tres días diferentes), mientras que la veracidad se estimó en términos de recuperación. El límite de cuantificación (LOQ) del método analítico se evaluó en niveles bajos de acuerdo con la guía para las situaciones en las que no hay ruido disponible que pueda ser medido [139]. El efecto matriz no se evaluó ya que hubo evidencia de diferencias significativas, no solo en la señal, sino en la forma de los picos. Por esta razón, siempre se usó la calibración con extracto de matriz (*matrix-matched*) con fines de cuantificación y validación. Se usó atrazina- $d_5$  como compuesto subrogado a la misma concentración en los experimentos de recuperación que promediaron 101,7% con una RSD de 17,5% ( $n=72$ , 3 valores atípicos). Ahora bien, teniendo en cuenta que el cálculo de la denominada recuperación "típica" sólo es factible para compuestos del mismo tipo (en su estructura o de un comportamiento similar), pero resulta inadecuada para analitos multiclase que muestran un comportamiento diferente, el grupo de compuestos en el alcance del estudio eran notablemente diferentes y conforme a esto requirieron un enfoque distinto. En la validación de los compuestos se incluyeron tres niveles de concentración, a excepción de la OTA que también se evaluó a una concentración por debajo de la normativa actualizada, a pesar de que su recuperación fue baja y diferían notablemente, tal como para el resto de los compuestos. Cuando se visualizan los resultados en la [Figura A23](#) (a) se puede obtener una idea de la distribución de las recuperaciones entre los analitos en cada nivel. Para contrastar las recuperaciones por nivel, se realizó una comparación global mediante un análisis de varianza para un diseño de medidas repetidas (RM-ANOVA) para evaluar las recuperaciones de todos los analitos, y de manera independiente. La [Figura A23](#) (b) muestra las recuperaciones totalizadas por nivel y las barras de error estándar entre cada analito y dentro de cada nivel que no son comparables con la variación de todos los compuestos; sin embargo, las barras presentadas por compuesto en la [Figura A23](#) (c) permiten ver la descomposición de la varianza y el error entre niveles (barras rojas) es mayor y diferente del error dentro del nivel (barras negras). Cuando se revisa el análisis hecho se cumple con los supuestos en la [Figura A23](#) (d, e) y esto hizo posible comparar de manera independiente entre los grupos

(f) observando diferencias significativas, no solo con el nivel más bajo, sino también entre las concentraciones evaluadas por compuesto. Esto confirma el hecho de que las recuperaciones deben informarse e interpretarse individualmente y por compuesto como se muestra en la [Tabla A5](#). Finalmente, a través de un histograma por nivel se muestra la distribución de los resultados de recuperación y la precisión asociada en la Figura 3-3 (a y b, respectivamente) donde una línea discontinua indica el valor promedio para observar visualmente la tendencia central. La segunda parte de la distribución del RSD en el nivel R1 (rojo) aparece claramente por encima del 25%, superando los límites de las recomendaciones de la guía SANTE/11312/2021. Lo anterior está en estrecha relación con los compuestos que solo alcanzaron 10 µg/kg como LOQ.

**Figura 3-3:** Visualización resumida de los resultados de la validación a diferentes niveles (R1: 5 µg/kg, R2: 10 µg/kg y R3: 20 µg/kg) en café tostado.<sup>23</sup>



<sup>23</sup> a) Histograma de la recuperación (R, %) en diferentes niveles presentados individualmente, la línea vertical discontinua indica el promedio "global" de todo el conjunto en cada nivel, (b) Histograma de la desviación estándar relativa (RSD, %) En diferentes niveles presentados individualmente, la línea vertical discontinua indica el promedio "global" de todo el conjunto en cada nivel.

Aunque la técnica LC-MS/MS sigue siendo el estándar para la cuantificación de AA en los alimentos [140], se debe tener cuidado con respecto a la presencia de interferencias en el café que puedan llevar a una sobreestimación de la AA [141]. Se han implementado esfuerzos para abordar este problema, como el uso de una derivatización con bromo [136]; sin embargo, una estrategia más simple para deshacerse de los interferentes que generan los mismos iones producto sugiere el uso de una fase acuosa sin acidificar como fase móvil [142]. Por lo tanto, se estableció 100% agua como composición inicial para el ejercicio de aplicabilidad al analizar un conjunto de muestras de café tostado de diferentes orígenes. A pesar de que, por diseño, las bombas que se usan en sistemas acoplados LC-MS solo permiten gradientes binarios, la válvula de selección ubicada en el bloque izquierdo del modelo del instrumento permite cambiar al reservorio de agua que está ubicado en una tercera línea (fase móvil D). Por lo tanto, el Método 4 se configuró sólo con agua, aunque solo durante los primeros 2 min y nuevamente, en los últimos 2 min con el fin de dar tiempo suficiente para poder eliminar el ácido de la columna antes de la siguiente inyección. Aunque la señal usada para la cuantificación de la AA sólo corresponde al ion producto  $m/z$ : 55,01784, la ventaja de usar el modo de adquisición FS-wPRM es que se pueden monitorear también las señales de precursores que, si estuvieran presentes, podrían generar el mismo ion producto [143]. La [Figura A24](#) muestra el método que utiliza la fase móvil A y las señales de los iones de la N-acetyl- $\beta$ -alanine, lactamide, 3-aminopropionamide y la valine a los  $m/z$ : 132,06552, 90,05495, 89,07094 y 118,0563, respectivamente. Estos resultados revelaron la presencia de picos alrededor del tiempo de retención de la AA y  $^{13}\text{C}$ -AA para los compuestos monitoreados, con excepción de la 3-aminopropionamide. Por el contrario, el tiempo de retención cambió ligeramente en el método que utiliza solo agua, desplazando las interferencias hacia la izquierda y mejorando la retención de la AA hasta 2,13 min. Posteriormente, el método se verificó mediante blancos fortificados ( $n = 4$ ) que muestran claramente la separación de un pico que estaba presente antes de 2 min ([Figura A25](#) a). Si bien al obtener recuperaciones aceptables del compuesto marcado serían suficientes para deducir que hay un buen rendimiento del método para este compuesto, es de mucha importancia que se haya revelado la presencia de compuestos que interfieren con el analito nativo. De hecho, esto podría explicar las altas recuperaciones generales observadas en la [Tabla A5](#) para la AA, especialmente a la concentración más baja, en contraste con el estándar interno marcado utilizado para trazar simultáneamente la recuperación que siempre se mantuvo muy cerca del 100%. Como se muestra en la [Tabla 3-1](#), se analizó un conjunto de 10 muestras compradas en varios

lugares, con diferente procesamiento (tostado y torrefacto), así como distinta variedad (*robusta* y *arábica*), para evaluar el riesgo de coelución en varios escenarios. La [Figura A25](#) b muestra una separación eficaz del pico izquierdo de la AA, que en realidad depende exclusivamente de la cromatografía para evitar una posible identificación errónea. Los interferentes se observan con suficiente desplazamiento (~1,79 min) para distinguirlos del pico que, de otro modo, podrían ocupar el tiempo de retención del analito. El recuperado de la AA sin marcar se indica con un pico notable en la señal roja a los 2,15 min. La ausencia de picos en la señal plana de color negro de la inyección de disolvente indica que el perfil de todos los demás EIC pertenece a compuestos coextraídos. La segunda señal de color negro de la muestra M07 (Licata, Italia) fue el único con una pequeña señal en el tiempo de retención de la AA, mucho menor a comparación del pico del recuperado a 400 mg/kg. Por lo general, se sabe que en general se venían reportando consistentemente altas concentraciones en muestras de café y han sido esos valores históricos los que se utilizaron como datos para establecer dichos BML. Aunque los valores bajos en estas muestras pueden parecer peculiares, métodos altamente selectivos han comenzado a reportar resultados notablemente inferiores al BML, incluso por debajo de 200 mg/kg [136], que es el LOQ del método actual.

**Tabla 3-1:** Muestras comerciales de café (marcas no mostradas) que fueron utilizadas en el estudio de aplicabilidad con diferente origen y características.<sup>24</sup>

Código de Muestra	Descripción de categoría			Hallazgos
	Mercado	Tipo	Variedad	Fracción másica (µg/kg)
<b>M01</b>	Buenos Aires, Argentina	Torrefacto 100%	Blend	Chlorpyrifos (< 5)
<b>M02</b>	Buenos Aires, Argentina	Torrefacto 100%	Blend	N.D.
<b>M03</b>	Madrid, España	Torrefacto 50%	Arabica	OTA (< 2,5)
<b>M04</b>	Uppsala, Suecia *	Roasted	Robusta	N.D.
<b>M05</b>	Madrid, España **	Roasted	Arabica	N.D.
<b>M06</b>	Madrid, España **	Torrefacto 100%	Arabica	N.D.
<b>M07</b>	Licata, Italia	Roasted	Blend	AA (< 200)
<b>M08</b>	Madrid, España	Torrefacto 100%	Blend	OTA (< 2,5)
<b>M09</b>	San Juan, Tolima**	Roasted	Arabica	N.D.
<b>M10</b>	San Antonio, Tolima**	Roasted	Arabica	N.D.

<sup>24</sup> Se indican los hallazgos confirmados debajo del LOQ. ND: No detectado. El trazo XIC para AA mostró una S/N<3 en todas las muestras excepto en la M07 (S/N=5,1). Se desconoce el origen único certificado para la mayoría de las marcas, excepto las indicadas como \*Brasil y \*\* Colombia.

Asimismo, la Tabla 3-1 muestra que ninguna de las muestras tuvo hallazgos superiores al nivel de reporte para los plaguicidas en el alcance del método. La presencia de residuos de plaguicidas actualmente es cada vez menor, estudios extensos con más de un centenar de muestras, han mostrado sólo unos cuantos plaguicidas polares sobre el LOQ [144]. No obstante, en una muestra de Argentina (M01: torrefacto, mezcla de robusta/arábica) si se encontró y se confirmó la presencia de chlorpyrifos ([Figura A26](#)) a una concentración en fracción de masa  $< 5 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Respecto a la OTA, la [Figura A27](#) muestra la confirmación de la presencia del ion producto  $m/z$ : 239.01030 en un par de muestras procedentes de España (M03 y M08). No obstante, estos hallazgos estuvieron por debajo del nivel más bajo de la curva de calibración y de la concentración media global ( $3,2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) que se ha reportado para el café y los productos a base de café [145]. Además, en un procedimiento separado las muestras se extrajeron con la mezcla MeOH y H<sub>2</sub>O (1:1, Mezcla 4) se analizaron para detectar las formas modificadas de OTA discutidas anteriormente; sin embargo, no se encontró evidencia de residuos del glucósido de la OTA, ni por PRM, ni por el modo de adquisición SIM. Sin picos apreciables alrededor de los 13,12 min se concluye que no hubo presencia de las formas modificadas; igualmente, la ausencia de la OTA se correlaciona. Asimismo, la ausencia de hallazgos en muestras reales de torrefacto podría explicarse por las condiciones de alta temperatura a las que se somete el café en el proceso de torrefacto industrial. En el caso hipotético de que exista alguna cantidad preexistente de la OTA que pueda provocar una potencial conjugación, en las tostadoras industrializadas o en las grandes fábricas de café el cilindro giratorio calienta la carga de 200 a 240° C [146], dejando pocas posibilidades de detectar cualquier cantidad de OTA enmascarada que quede, como se observó en los experimentos de calentamiento donde se alcanzaron temperaturas superiores a la de la descomposición de la sacarosa. Sin embargo, no todos los cafés se tuestan en la misma medida, y el mercado hoy en día ofrece una gran cantidad de sabores de tueste. Desde el tueste oscuro italiano hasta el estilo de Nueva Inglaterra, un grado de tueste ligero ajustado por los tostadores profesionales para mantener algunas notas y matices clave en taza; evita condiciones de alta temperatura por debajo del tratamiento estándar, lo que supone un escenario moderado donde podrían persistir potenciales modificaciones que hayan sido formadas.

## **4. Capítulo 4: Contaminantes potenciales en el procesamiento a alta temperatura**

Los HAPs se forman durante procesos de combustión incompleta, siempre que se quema materia orgánica o durante procesamiento de alimentos con materiales como madera, carbón o combustibles, pueden aparecer compuestos con heteroátomos como nitrógeno y azufre, incluyendo especies oxigenadas que dan lugar a una gran variedad de compuestos relacionados. Luego, los HAPs se pueden encontrar en mezclas complejas en el ambiente, incluyendo también en una variedad de productos alimenticios que son sometidos a procesamiento térmico intenso, como es el caso del tostado del café.

### **4.1 Preliminares para el desarrollo de un método**

Debido a la singular estructura de los HAPs, es indispensable tener en cuenta varias consideraciones para llevar a cabo una separación cromatográfica adecuada que evite una potencial acumulación de los analitos en varias regiones del instrumento y que pueda conducir a una contaminación cruzada. Los compuestos del grupo HAPs cuentan con un amplio rango de peso molecular y puntos de ebullición; además, debido a su estructura planar desarrollan interacciones intermoleculares significativas que se manifiestan en una deposición recurrente en las superficies y resultan ser difíciles de vaporizar. Además, los picos tienden a presentar coleo y los compuestos con mayor punto de ebullición pueden quedar retenidos en la cabeza de la columna, lo que hace necesario cortar frecuentemente la punta de la columna. Por consiguiente, mantener una alta temperatura en diferentes zonas es importante para minimizar el contacto con las superficies. En primer lugar, el puerto de inyección y la línea de transferencia MSD se deben mantener a 320 °C como mínimo, esta temperatura está limitada por el rango recomendado por el fabricante de la

columna, pero el uso de columnas metálicas podría ayudar a mantener una temperatura incluso superior. Además, la fuente de MS debe mantenerse a un mínimo de 320 °C. A pesar de que el tiempo de residencia es prolongado en el modo *splitless*, comparado con el modo de división de flujo *split*, el uso de un pulso de presión ayuda a disminuir el tiempo y maximizar la transferencia a la columna. Con relación a la detección, la notable estabilidad de estas moléculas se traduce en la dificultad para lograr una fragmentación extensiva, que tampoco se alcanza fácilmente vía colisión por fragmentación inducida en la celda de colisión del GC-MS/MS. Para resolver este problema, recientemente se ha investigado el uso de “pseudo-transiciones” en diferentes tipos de analizadores [147], esto es, la selección de la misma masa del precursor en cuadrupolo de aislamiento de los iones producto. A pesar de que esto puede asemejarse más al modo SIM, los autores aducen que la etapa de fragmentación con “voltajes no nulos” permite eliminar interferencias para lograr una mejor sensibilidad. No obstante, a pesar de que experimentalmente se observó que los HAPs son, en efecto, difíciles de fragmentar, para la optimización de la energía de colisión se seleccionaron los fragmentos reales que aseguren una mayor selectividad en matrices complejas como el café. Para esto se tomaron los fragmentos más prominentes y se ejecutó una rutina de optimización del método dMRM<sup>25</sup>.

Los resultados se detallan en la [Figura A28](#) que muestra, en el caso del Naphthalene-d<sub>8</sub> una abundancia máxima del ion producto entre 25-30 V. En el caso del Acenaphthalene-d<sub>10</sub> se revisaron más iones y son las transiciones que corresponden a pequeñas pérdidas las que generan abundancias mayores a  $1,5 \times 10^5$  (p.e. 164 >162, y 162>160). Una situación parecida ocurre para el Fluorene-d<sub>10</sub>, que a 40 V muestra la mayor abundancia para la transición 174>170 cuando se compara con las demás transiciones. Como conclusión, en la optimización la energía de colisión, el valor del potencial que permite obtener la mayor abundancia es relativamente bajo para la mayoría de compuestos, no obstante, no se hizo uso de “pseudo-transiciones” sino de un programa optimizado de transiciones que se detalla en la [Tabla A6](#) del Anexo A. Una vez establecido el método instrumental, se procedió a realizar pruebas preliminares para la extracción de los HAPs empleando la mezcla del método EPA 525 que contiene sólo 4 compuestos (diferentes al grupo PAH4). Se usó el mismo concepto “dSPME” empleado para la extracción de la AA,

---

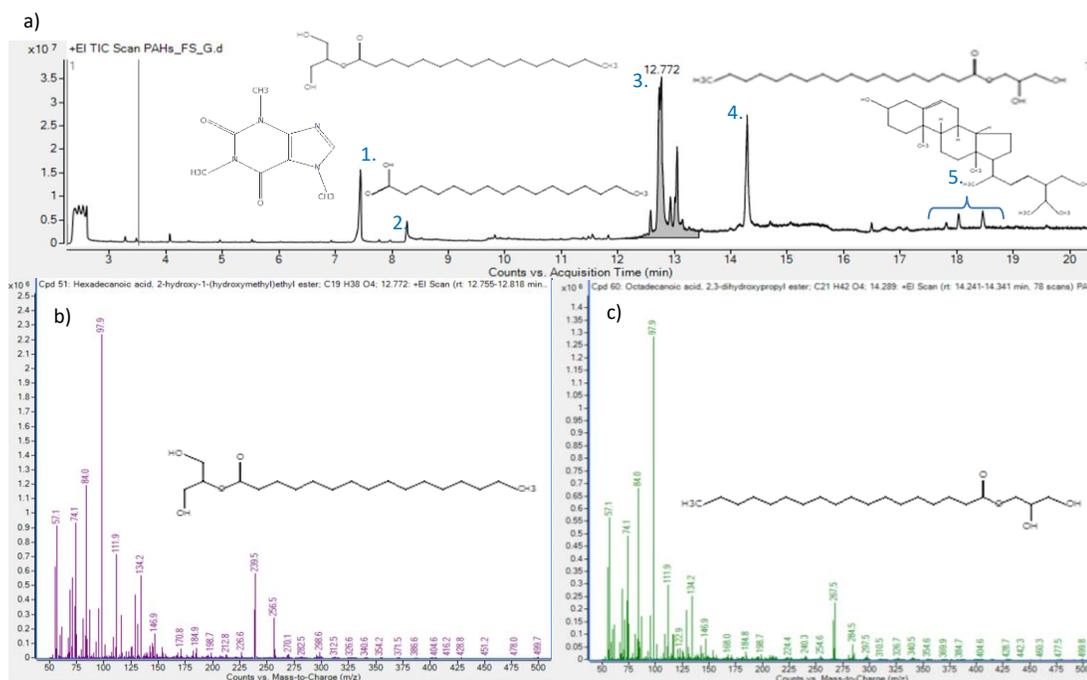
<sup>25</sup> *Dynamic Multiple Reaction Monitoring*, modo propiedad de Agilent Technologies®

ya que el AcOEt se ha usado en el análisis de HAPs [148]. La anterior propuesta se basó en registros de mayor eficiencia en la extracción de HAPs mediante el uso de AcOEt vs. ACN, ya que los resultados mostraban como problemáticas las bajas recuperaciones por el método QuEChERS [149] cuando se usa GCB en combinación con adsorbentes dSPE durante el *cleanup*. Precisamente por esto, se decidió implementar el método dSPME “en tubo” empleando GCB para la retención de los HAPs. A escala molecular, la superficie del grafito es plana y cristalina. La retención de sustancias polares viene dada por la interacción de grupos polares o polarizables de las moléculas del analito con la superficie del grafito. La fuerza de las interacciones depende del área molecular en contacto con la superficie, que en esta aplicación resulta ideal para retener este tipo de compuestos. La superficie del grafito presenta electrones  $\pi$  en forma de nube deslocalizada, lo que podría facilitar un mecanismo para la retención de moléculas con enlaces  $\pi$  o compuestos aromáticos, como los HAPs. No obstante, los compuestos aromáticos tridimensionales como los bifenilos policlorados (PCBs) tienen pocos puntos de contacto con la superficie y se retienen menos en comparación con las moléculas planas que tienen la posibilidad de interactuar en mayor medida con la superficie, y así tener mayor retención. Con este precedente, el método preliminar consistió en la adsorción de los HAPs del AcOEt en GCB, para luego lavarlos con acetona. Luego se evapora rápidamente la acetona y al residuo restante se le adiciona AcOEt para hacerlo compatible con el método instrumental (GC), redisolviendo así los HAPs y con la ventaja de poder concentrar el extracto varias veces (p.e.: x5). Se realizó una curva de calibración y ensayos de recuperación preliminares para los 4 HAPs a 12,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  con el método dSPME-GC empleando GCB en modo dMRM (GC-MS/MS). Los resultados mostraron porcentajes de recuperación con RSD aceptables: acenaphthene 110,5 (10,2%), phenanthrene 94,3 (9,4%), crysene 81,2 (8,1%), y benzo(a)pyrene 80,5 (10,3%). Con base en estos resultados, se decidió extender la prueba empleando un mayor número de HAPs, pero además, se evaluó el uso de n-hexano en vez de acetona para la desorción del GCB ya que la sensibilidad para los compuestos más pesados realmente fue muy baja para los iones de calificación del benzo(a)pyrene que se encontraban al límite del ruido como se muestra en la [Figura A29](#).

La selección del n-hexano como reemplazo de la acetona tuvo la intención de evitar una desorción indiscriminada de otros componentes endógenos que hayan sido adsorbidos, éstos podrían pasar al inyectable al presentar algún grado de polaridad, impactando la sensibilidad. La [Figura A30](#) muestra una comparación en términos absolutos donde hay menor recuperación empleando n-hexano en todos los casos, y una disminución general

de la desorción alrededor del 50%. Teniendo en cuenta que el uso de la acetona es importante para asegurar la desorción, se revisó el TIC de una inyección en *Full Scan* del extracto GCB y, en efecto, se encontraron múltiples compuestos endógenos. La Figura 4-1 muestra el perfil cromatográfico del extracto y los compuestos identificados empleando la biblioteca NIST 2014 integrada en el software MassHunter® Qualitative Analysis (Figura A31). Aunque los compuestos en los picos numerados de 1-5 hacen parte de la composición típica del café, se revisaron los espectros experimentales en búsqueda de fragmentaciones explicables detalladas en la Tabla A7 teniendo en cuenta que su fragmentación puede que no sea específica, y para así soportar los resultados de comparación del espectro completo encontradas en la biblioteca NIST.

Figura 4-1: Componentes endógenos del extracto de AcOEt con el método dSPME-GC empleando GCB y acetona.<sup>26</sup>



En la búsqueda de una alternativa más limpia al GCB, se probaron diferentes adsorbentes para generar extractos con menor cantidad de compuestos coextraídos ya que estas moléculas podrían actuar como interferencias potenciales y compuestos que disminuyen el rendimiento del instrumento. La Figura A32 muestra un comparativo del TIC en modo

<sup>26</sup> a) El TIC muestra los compuestos (picos 1-5) identificados en modo FS. Detalle de los espectros de masas para la identificación de los acilglicérols representados como estructuras de monoglicéridos del b) ácido palmítico (hexadecanoic acid) y c) ácido esteárico (octadecanoic acid).

FS de extractos de café obtenidos por el método dSPME-GC empleando adsorbentes alternativos como florisil, sílica y alúmina desactivada al 1%. A pesar de que los perfiles son muy similares al de referencia (GCB), en el caso de la alúmina se observa menor cantidad de acilglicerol relacionados al ácido palmítico y la ausencia del pico del ácido esteárico. Por consiguiente, se realizaron pruebas de recuperación de los 12 HAPs empleando alúmina en el método dSPME-GC, cuyos resultados se muestran en la [Figura A33](#). La alúmina se caracteriza por exhibir grupos óxido e hidróxido que contribuyen a la carga negativa en su superficie que puede atraer ácidos de Lewis o especies con carga positiva (deficientes en electrones). La superficie del adsorbente interactúa a través de diferentes grupos funcionales (-OH, C-H, Al-O y Al-O-Al) que probablemente pueden participar en la retención de los HAPs [150]. Por otro lado, y teniendo en cuenta que los experimentos realizados hasta ahora contemplaron el uso del mismo esquema de extracción simultánea, que hace uso de una fase acuosa y una orgánica del método “todo en uno” (*All-in-One*, AIO), se realizó una comparación para simplificar el procedimiento y realizar una extracción exclusivamente con AcOEt. La [Figura A34](#) muestra los resultados de los ensayos de recuperación de 12 HAPs en los que se pueden observar dos comportamientos. Primero, para la mayoría de compuestos en las dos primeras columnas realmente no se comparte el mismo rango de recuperación al comparar la extracción AIO vs. la versión simplificada (AcOEt). Aun así, el resto de los compuestos tienen un comportamiento más parecido, y por lo tanto para evaluar si hay evidencia de diferencias significativas entre las extracciones se evaluaron en un grupo distinto empleando un Análisis Multivariado (MANOVA). Aunque algunos de los supuestos del MANOVA no se cumplan, la ventaja de utilizar el método de Pillai es que es un estadístico robusto que no se ve afectado por violaciones del supuesto de las matrices de covarianza. Sin embargo, la prueba Pillai puede ser sensible a violaciones de la normalidad y verse influenciado por el tamaño de la muestra, que es una debilidad del diseño experimental usado en este caso. Sin embargo, esta medida indica el efecto general del método de extracción sobre la recuperación. La [Tabla A8](#) muestra la salida para el grupo de 4 HAPs evaluado inicialmente, en la que se observa una correspondencia con lo expuesto anteriormente ya que hay evidencia de diferencias significativas en la recuperación de estos compuestos ( $P < 0,05$ ). No obstante, se realizó el mismo análisis para el grupo de compuestos que se observan más distantes en los gráficos de cajas, con un resultado no significativo. Este resultado es consistente al de la  $T^2$  de Hotelling, que es una medida de la distancia entre las medias de los grupos en un espacio multivariado (0,2228). Al revisar las pruebas de los

compuestos individuales ninguna resulta ser significativa, con lo que se decidió realizar las extracciones únicamente con AcOEt. Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó una comparación de desempeño usando AcOEt como solvente de extracción y alúmina como adsorbente a niveles de concentración cercanos al límite de sensibilidad con resultados que se muestran en la Tabla 4-1.

**Tabla 4-1:** Ensayos de recuperación preliminares para 12 HAPs a bajas concentraciones con el método dSPME-GC empleando alúmina en modo dMRM (GC-MS/MS).<sup>27</sup>

HAPs	%Recuperación (%RSD), (n=3)			
	2,5 µg/kg	5,0 µg/kg	10 µg/kg	15 µg/kg
Acenaphthene	70 (6,4)	69,4 (2,6)	75,5 (1,5)	71,4 (0,1)
Fluorene	89,3 (8,3)	76,6 (6,2)	79,2 (6,4)	74,5 (0,02)
Anthracene	112,3 (8,3)	90,2 (4,5)	89,3 (5,4)	80,7 (1,4)
Phanathrene	89 (5,9)	86,2 (8,8)	77,1 (2,3)	69,4 (2,6)
Fluoranthene	91,8 (5,2)	82,3 (2,3)	83,9 (2,4)	79,4 (1,9)
Pyrene	105,5 (6,7)	87,7 (3,3)	88,1 (5,8)	77 (3,7)
Benz(a)anthracene	52,2 (20,8)	59,7 (10,8)	56 (35,5)	66,2 (0,3)
Crysene	78,7 (10,5)	82,8 (13,7)	89 (3,4)	82,5 (4)
Benzo(a)pyrene*	159,5 (4,9)	132,2 (3,5)	124,6 (2,9)	115,5 (3,8)
Benzo(b)fluoranthene	61,7 (7,5)	65,4 (5,2)	72,7 (1,1)	70,2 (0,6)
Benzo[g,i,h]perylene	60,1 (6,7)	57,1 (3,9)	62,4 (2,8)	40,4 (47,7)

En la tabla anterior no se muestran resultados para el naphtalene, ya que se obtienen valores excesivos del porcentaje de recuperación debido a la presencia permanente de un pico al mismo tiempo de retención en la matriz “blanco” o sin fortificar. Asimismo, en el caso del benz(a)pyrene se evidencia la misma situación, recuperaciones aparentemente altas, y, que en este caso disminuyen en función de la concentración de manera pronunciada. Teniendo en cuenta la dificultad de contar con un material sin presencia de HAPs que realmente sirva como blanco en el caso del café se hace difícil realizar los estudios de recuperación de algunos compuestos. De hecho, recientemente se ha abordado el tema de la posibilidad de realizar correcciones empleando el porcentaje de recuperación de los HAPs [151]. La alternativa planteada a la corrección en ese estudio es el uso de estándares que se someten al mismo tratamiento que las muestras, sin embargo, la incertidumbre de ambos métodos es equivalente sólo cuando no hay desviaciones significativas, que, según los resultados que estuvieron enfocados en agua, se reportan pérdidas de cerca al 50% del naphtalene. Ahora bien, bajo las condiciones de la presente investigación, también se observó que los compuestos coextraídos pueden acumularse en el sistema y así terminar afectando la robustez del método en las inyecciones posteriores

<sup>27</sup> \*Pico pre-existente al mismo tiempo de retención en la matriz sin fortificar, no se presenta el naphtalene.

de la secuencia. Esto se presentó particularmente en los compuestos de mayor peso molecular de la [Figura A35](#), ya que el ruido de fondo tuvo un gran impacto en los ILIS, lo que hizo inviable una cuantificación fiable.

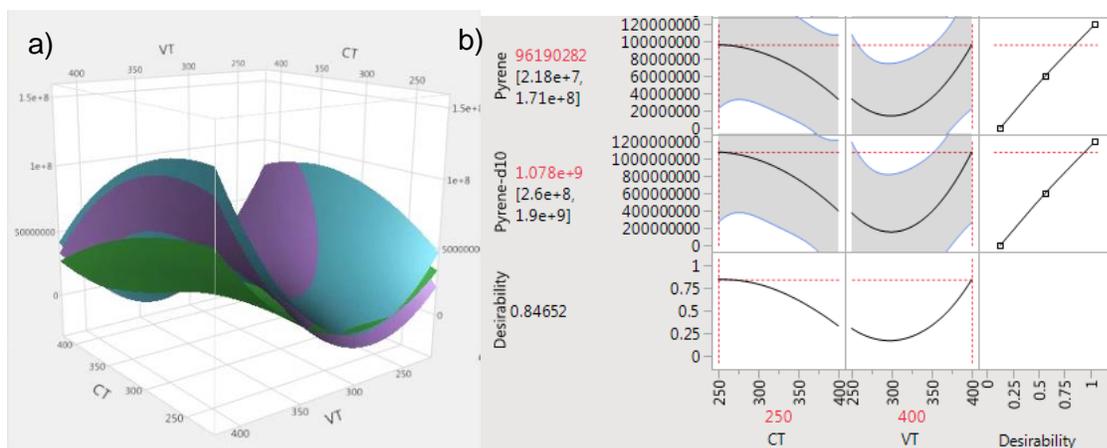
## 4.2 Explorando una alternativa por LC-APCI-HRMS

La determinación de los HAPs por GC-MS/MS ha sido ampliamente usada en diferentes aplicaciones. La cromatografía líquida acoplada con el detector de fluorescencia (LC-FLD) es una de las técnicas que permiten la determinación a niveles de concentración muy bajos [152, 153]. Se ha visto en la sección anterior, los problemas de sensibilidad afectan fuertemente a los últimos compuestos y reflejan un alto grado de discriminación ([Figura A36](#)), que, sumado al ruido de fondo, dificulta la determinación de los HAPs más pesados como el Benzo[g,h,i]perylene. Por lo tanto, la posibilidad de emplear una técnica basada en LC tiene dos ventajas importantes. Primero, menos ruido de fondo instrumental derivado de la alta temperatura de elución propia del programa del horno y que en los métodos MS/MS, sin estar ausente, puede pasar desapercibido. Además, al usar en el inyectable un solvente compatible con LC como el ACN, se puede descartar gran parte de la fracción lipídica disminuyendo el ruido de matriz y mejorando la robustez. En este sentido, se ejecutó un método simple descrito en pocos pasos. Se toma una alícuota de 150  $\mu\text{L}$  del extracto de AcOEt (250  $\mu\text{L}$ ), se transfiere a un tubo cónico de polipropileno, se lleva a sequedad en corriente de nitrógeno y se redisuelve en 15  $\mu\text{L}$  de ACN con agitación fuerte en un vortex. Posteriormente se toma una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  que se diluye a la mitad con ACN en un microvial para ser inyectado en LC-APCI-HRMS, una sonda que permite la determinación de moléculas de baja polaridad usando un mecanismo de ionización secundaria que se da lugar al interior de la interfaz a presión atmosférica. La [Figura A37](#) del Anexo A muestra los resultados de un nivel de HAPs en matriz empleando condiciones de operación estandarizadas por el fabricante para un flujo de 0,3 mL/min. Por un lado, se observa que los picos no cuentan con picos adyacentes o ruido de fondo al hacer uso de una resolución de 70000 FWHM; además, también es claro que el cromatograma cuenta con picos un poco más anchos, pero más simétricos que los obtenidos en GC-MS/MS. Adicionalmente, se logran observar un par de picos resaltados en negro que corresponden al EIC con una MEW de 5ppm del m/z: 276,0934 perteneciente al benzo[g,h,i]perylene (barra roja). La discriminación vista en GC-MS/MS no se observa, ya que la señal es

relativamente similar a las de los demás compuestos. Igualmente, la curva de calibración corregida por el ILIS (sin ruido apreciable) muestra un rango lineal con excelente linealidad. Lamentablemente, la sensibilidad asociada con esta técnica de ionización no se compara con la alcanzada en HPLC-FLD [154], aunque también es cierto que esta última no está exenta de presentar problemas de selectividad, como se ha presentado para matrices complejas como el té negro [155] con un ruido de fondo tal, que puede limitar fuertemente la cantidad mínima detectable. Por lo tanto, para aprovechar el alto poder de resolución en HRMS se requiere una optimización de la sonda APCI para lograr mejorar los niveles de sensibilidad dentro de las posibilidades y limitaciones de la técnica [156]. El uso de DOE ha demostrado ser una estrategia útil para optimizar la configuración de la interfaz a presión atmosférica con sondas como la HESI [97]. Su ventaja radica en el cálculo de condiciones más adecuadas para mejorar la sensibilidad del instrumento minimizando la cantidad de experimentos necesarios para evaluar diferentes variables al mismo tiempo. El proceso de optimización se llevó a cabo en dos pasos. En el primer paso, se utilizó un diseño de Plackett y Burman para determinar cuáles de las variables probadas tienen la mayor contribución a la varianza de la respuesta generalizada de los diferentes analitos evaluados. Una vez seleccionadas las variables más importantes, se reanalizaron los resultados empleando un DOE más pequeño para determinar los valores numéricos de las variables clave que aumentan más la respuesta medida. La elección de los parámetros evaluados se basó en el impacto que puede tener en la eficiencia del proceso que ocurre en la sonda APCI. Para promover la formación de los iones en fase gaseosa que son blanco de la ionización secundaria se incluyó el flujo de gas que asiste la nebulización o *sheath gas* (SG), el flujo de gas auxiliar (AG), la temperatura del tubo de transferencia o capilar (CT), la temperatura de vaporización (VT), la corriente de la aguja corona (CC) y el voltaje de la guía de iones de electrodos apilados o *Stacked Ring Ion Guide*, conocido comercialmente como “S-lens” (RF). Después de crear métodos individuales para 21 combinaciones de factores sugeridas por el software SAS-JMP Statistical Discovery™ v13 que están consignadas en la [Tabla A9](#), se configuraron dos métodos adicionales para el espectrómetro de masas a modo de controles empleando las condiciones originalmente usadas en los experimentos preliminares (PreOpt), junto con las condiciones generadas automáticamente por el software Tune™ (TFS). Los resultados del *screening* realizado a partir del diseño de Plackett y Burman se encuentran en la [Tabla A10](#) donde se incluyeron barras comparativas para visualizar rápidamente qué pruebas resultaron tener combinaciones más efectivas en el aumento de la señal. En primer lugar, en la tabla se

puede observar que los efectos de las combinaciones sobre las respuestas son relativamente uniformes a través de las diferentes moléculas. Así mismo, se observa que las mejores combinaciones (1 y 13) resultan superiores a las referencias control. Ahora bien, la diferencia relativa entre las combinaciones seleccionadas indica que algunas moléculas tienen más de un 10% de diferencias resaltadas con barras de color. La última columna con código de color ayudó a escoger los parámetros CT y VT como los efectos principales más frecuentes que deben ser optimizados en el modelo cuadrático. El diseño compuesto central es un diseño completo factorial, útil en la metodología de superficie de respuesta (RSM), para construir un modelo de segundo orden para la variable de respuesta. La ventaja de usar este diseño es que se pueden usar las pruebas realizadas en el diseño de screening que ya contienen el conjunto de combinaciones necesarias para proyectar un diseño  $2^k$  sin necesidad de realizar experimentos adicionales tal como se ha realizado en optimizaciones similares [157]. Se analizaron un conjunto de 9 combinaciones empleando el software SAS-JMP Statistical Discovery™ v13 y se calcularon las superficies de respuesta cuyos polinomios de segundo grado se encuentran resumidos en la [Tabla A11](#). La figura 4-2 (a) muestra ejemplos de las superficies de respuesta de tres moléculas que cubren el rango de peso molecular de los HAPs estudiados con un comportamiento similar, (b) como en el caso de la comparación de los perfiles entre el ejemplo del pyrene y su correspondiente ILIS, donde no se observan diferencias apreciables para este, ni para los demás HAPs evaluados.

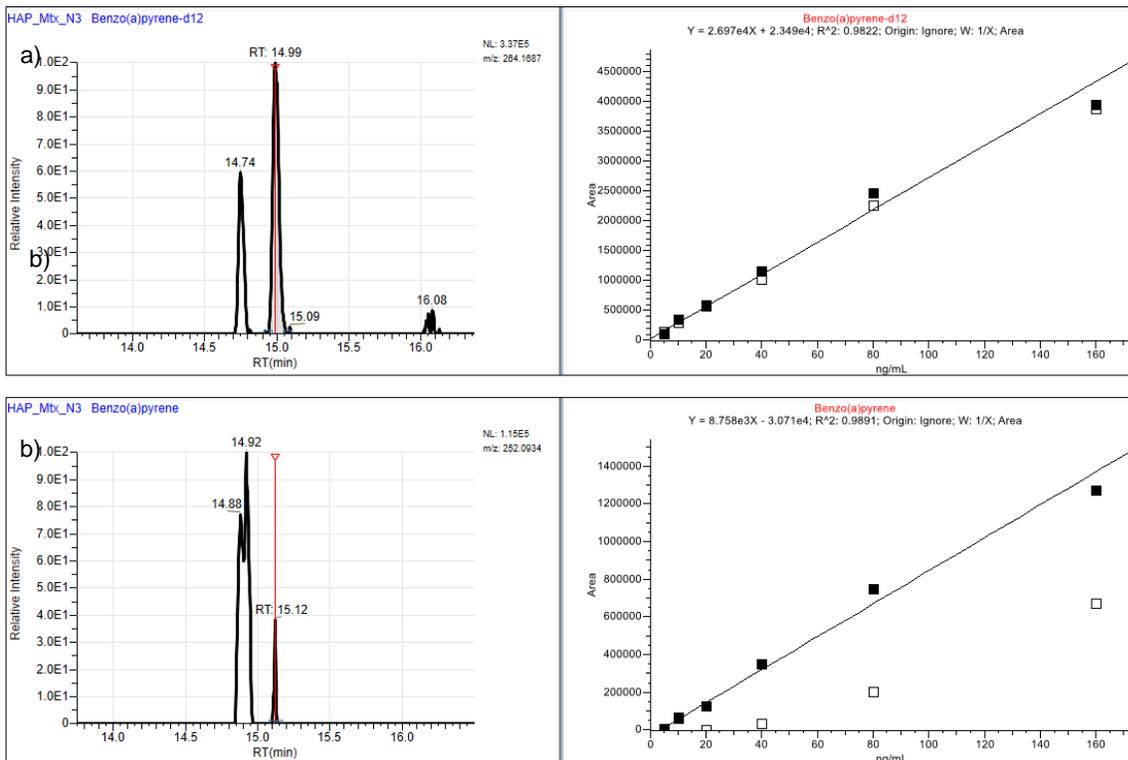
**Figura 4-2:** Modelo de Superficie de respuesta (RSM) para interfaz LC-APCI-HRMS. <sup>28</sup>



<sup>28</sup> a) Superposición de las superficies de respuesta de tres moléculas ejemplo (verde: naphtalene, púrpura: pyrene y azul: benzo[g,i,h]perylene). b) Ejemplo del perfil de cada parámetro para pyrene, pyrene-d10 y la función de deseabilidad general.

Al analizar estos resultados de manera general y a partir de la función de deseabilidad se podría pensar que las condiciones óptimas de los factores CT y VT resultan ser 250 °C y 400 °C, respectivamente. Esta combinación corresponde a la prueba 13 del diseño de Plackett y Burman, sin embargo, y como ya se ha discutido antes, unas condiciones de temperatura bajas favorecen una posible acumulación en las superficies que podrían llevar al deterioro del rendimiento, mantenimientos más frecuentes e incluso a una potencial contaminación cruzada. Así las cosas, se escogen las condiciones de la prueba 1 con una diferencia relativa menor al 10% para la mayoría de los compuestos que favorecen en algunos casos a los compuestos más pesados.

Una vez seleccionados los valores óptimos de los parámetros de la interfaz APCI, se procedió a realizar la evaluación del efecto matriz. Se construyeron curvas de calibración con las respuestas absolutas en solvente y en extracto de café. En general los compuestos tienen una buena linealidad como se mostró anteriormente en área relativa ([Figura A37 d](#)). No obstante, una buena correspondencia en las pendientes en solvente y matriz con un  $R^2$  aceptable como el observado en la Figura 4-3 a para el benzo(a)pyrene- $d_{12}$ , no es garantía suficiente para poder hacer una cuantificación adecuada. Lo anterior debido a que, a diferencia de la curva en solvente, la presencia de la matriz si tiene un impacto muy fuerte sobre la respuesta del benzo(a)pyrene. La supresión iónica sobre este compuesto es tal, que como se observa en el cromatograma (b), el pico a 20 ng/mL casi desaparece, no así para los picos adyacentes de benzo(b)fluoranthene y benzo(k)fluoranthene. Esta supresión diferencial que se da, tanto entre el compuesto y su ILIS, como de manera diferencial con otros compuestos estructuralmente similares, da cuenta de la presencia de un marcado efecto matriz que es altamente dependiente del tipo de compuesto.

**Figura 4-3:** Efecto matriz en PAHs por LC-APCI-HRMS, curvas de calibración en solvente (■) y en matriz (□).<sup>29</sup>

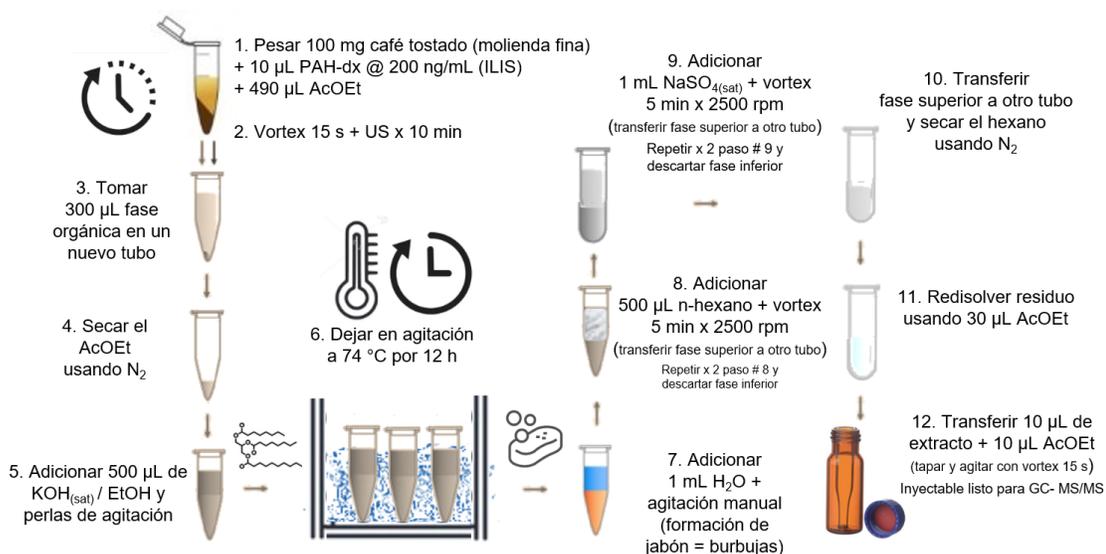
Es importante aclarar que esta situación termina afectando en gran medida la posibilidad de realizar la cuantificación de los HAPs por LC-APCI-HRMS, pues a pesar de que el uso de ILIS puede corregir idealmente el efecto matriz por considerarse una molécula modelo virtualmente sometida a las mismas condiciones del analito, resulta que si se observan diferencias apreciables en el tiempo de retención ( $\Delta t > 0,1$  min) en estas moléculas perdeuteradas. En este ejemplo el benz(a)pyrene termina muy impactado por algún componente de la matriz que coeluye, y, por lo tanto, esta técnica no se recomienda para cuantificar los HAPs, y se restringe su uso para aprovecharlo en un enfoque confirmatorio.

<sup>29</sup> a) Benz(a)pyrene-d<sub>12</sub> a m/z: 264.1687, efecto matriz aparentemente despreciable. b) Benz(a)pyrene a m/z: 252.0934, supresión iónica con un fuerte impacto en la sensibilidad.

### 4.3 Determinación de HAPs por GC-MS/MS

Algunos autores indican que la técnica GC-MS es el mejor acoplamiento posible para el análisis de HAPs a niveles bajos de concentración en diferentes tipos de muestras. De hecho, Ghislain [158] hizo un estudio comparativo en el que concluye que no existe una fuente de ionización a presión atmosférica que permita una ionización eficiente de los HAPs en sistemas con acoplamiento LC-MS, aparte de la ionización láser a presión atmosférica (APLI) que es muy poco común. Conforme a esto y con base en los resultados obtenidos previamente, en este punto se propone replantear la metodología basada en la técnica por GC-MS/MS, pero empleando un procesamiento de muestra que asegure obtener un extracto limpio y que permita hacer la cuantificación de los HAPs, pero sin un impacto tan fuerte en la selectividad ni en el desempeño del instrumento. Inspirado en un método de determinación de HAPs que está basado en varios pasos, incluyendo la saponificación directa o de extractos [159], se realizó un procesamiento de muestra como el del esquema de la Figura 4-4. A continuación se explica brevemente, se realiza una transesterificación del residuo seco de la fase orgánica con KOH/EtOH. La formación de burbujas evidencia una saponificación exitosa, se procede a la partición con n-hexano asistida con perlas y vortex. Luego se hace una limpieza consecutiva del extracto orgánico con solución salina, que finalmente se seca con una corriente de nitrógeno. Un residuo blanco se redissuelve en AcOEt para su análisis por GC-MS/MS. Ver [Figura A38](#).

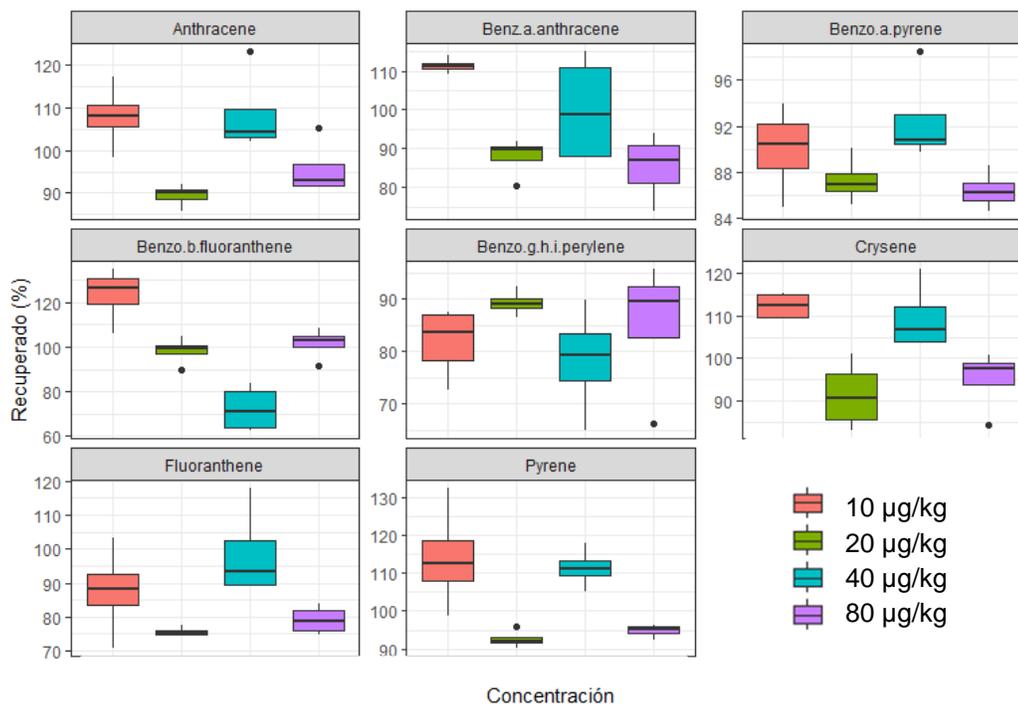
**Figura 4-4:** Enfoque mini-método para la determinación de HAPs en café tostado por extracción con AcOEt, transesterificación y análisis por GC-MS/MS.



Se realizaron extracciones de cafés locales de diferente tueste para combinar sus extractos y obtener una matriz representativa (*pooled*) y proceder a la inyección en GC-MS/MS del extracto sin fortificar (blanco) y fortificado a 12,5 µg/mL (nivel). Se identificaron los HAPs en el nivel empleando las transiciones establecidas en el método de adquisición dMRM. La [Figura A39](#) del Anexo A muestra una comparación de los picos encontrados de las transiciones de HAPs vs. la matriz fortificada post-extracción. La presencia de picos en las ventanas de extracción de iones al mismo tiempo de retención en la matriz, y un ruido excesivo puede limitar la habilidad del método para diferenciar los compuestos en niveles o muestras reales, ya sea porque las señales pueden pertenecer a interferentes, o bien, a los analitos. Al revisar los cromatogramas de los compuestos de elución temprana, la presencia de señales es permanente, mientras que, para el caso de los demás compuestos no se observa esta situación. Un ejemplo de ello es que en la ventana del phenanthrene, un pico en el blanco suma cerca del 30% del área del nivel. Particularmente, este compuesto comparte las mismas transiciones del anthracene, y por esto siempre se ve acompañado de un pico adyacente separado cromatográficamente con una resolución aceptable. La situación que se presenta con el phenanthrene puede comprometer la selectividad y la posibilidad de diferenciar un hallazgo y cuantificarlo correctamente en una muestra debido a la presencia de estas señales en el blanco, afectando la determinación de los analitos, no así a su vecino isobárico. Vale la pena notar que en esta misma ventana se ha incluido un recuadro discontinuo que muestra la ausencia de un pico en el tiempo de retención del anthracene, lo cual llevó a realizar una clasificación de los analitos en grupos para un manejo más sencillo de los HAPs que llevar a cabo un tratamiento caso a caso. Teniendo en cuenta que este conjunto de 4 compuestos son analitos de elución temprana se aplicó un sistema de clasificación para categorizarlos como HAPs “ligeros” (grupo I), asimismo los siguientes 4 analitos (anthracene, fluoranthene, pyrene y crysene), y aunque estrictamente el primero y el último tienen pares isobáricos, se clasificaron como HAPs “intermedios” (grupo II); y por último, los 4 HAPs mostrados en la sección b que son los de mayor peso molecular, precisamente fueron clasificados como HAPs “pesados” (grupo III). De este modo se crearon tres grupos de elución temprana/media/tardía y se descarta el primer grupo de los ensayos de recuperación por falta de selectividad. Para la validación, se realizaron fortificaciones a 4 niveles de concentración (10 – 80 µg/kg), 4 ensayos de recuperación por nivel, se inyectaron curvas de calibración de 6 niveles por triplicado (5-160 ng/mL), solventes intermedios y la evaluación de *carryover* con inyecciones sucesivas de solvente después del nivel más alto de la curva de calibración.

La Figura 4-5 muestra los resultados de recuperados de los grupos II y III, fortificados a diferente concentración (10, 20, 40 y 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Con el objetivo de consolidar los resultados para tener una idea general del desempeño del método, y teniendo en cuenta que en gran medida los HAPs son moléculas que comparten su estructura, su geometría es planar en todos los casos y no difieren químicamente en términos de grupos funcionales, sino por el contrario sólo en su peso molecular, se decidió verificar si se podía establecer parámetros de estimación típicos. Sin embargo, en primer lugar, se revisó la existencia de una posible dependencia en función del nivel de concentración para caracterizar el desempeño por molécula. Para ello se realizó un MANOVA para revisar si es posible considerar que los resultados no son significativamente diferentes a través de las concentraciones evaluadas. En efecto, se evidenciaron diferencias significativas cuando se incluyó el nivel más bajo de concentración; mientras que, al considerar únicamente las concentraciones de los demás niveles no se presentaron diferencias significativas ( $p =$  grupo II: 0,07908, grupo III: 0,1518).

**Figura 4-5:** Diagramas de cajas del % recuperación (10, 20, 40 y 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) para los grupos II y III en café tostado por extracción con AcOEt, transesterificación y análisis por GC-MS/MS.



Estos resultados están relacionados con la presencia de algunos *outliers* en el nivel más bajo, que pueden ser retirados (como en la figura), aunque también se puede calcular una medida de tendencia central más robusta este tipo de situaciones como la mediana. Una

comparación entre los valores globales en cada caso se presenta en la Tabla 4-2. Con base en lo anterior, se decide establecer el nivel evaluado más bajo como LOQ y calcular los valores típicos de precisión y porcentaje de recuperación para los demás niveles para obtener la información consolidada que se muestra a continuación.

**Tabla 4-2:** Exactitud y precisión del método de transesterificación por GC-MS/MS.

HAPs	10, 20, 40 y 80 µg/kg		20, 40 y 80 µg/kg		10 µg/kg	
	%R Sin outliers	%R Mediana	%R Típico	%CV Típico	%R al LOQ	%CV al LOQ
Anthracene	100,4	100,2	97,8	6,8	107,9	7,1
Fluoranthene	85,2	82,5	84,4	8,6	87,7	15,2
Pyrene	103,2	97,5	99,6	3,3	114,1	12,4
Crysene	102,1	102,4	98,6	8,1	111,4	1,7
Benz.a.anthracene	96,2	91,0	91,2	10,6	112,3	2,8
Benzo.b.fluoranthene	98,8	101,0	90,6	10,1	123,4	10,1
Benzo.a.pyrene	89,0	89,0	88,7	3,1	90,0	4,2
Benzo.g.h.i.perylene	83,7	87,3	84,3	11,8	81,8	8,6

Aunque el promedio aritmético puede dar una idea de los valores típicos por grupo, el resultado numérico empleando la manera correcta de consolidar la varianza (*S pooled*) suele ser ligeramente diferente. Por esta razón, se realizó el cálculo adecuado para obtener finalmente los siguientes resultados: grupo II (%R<sub>Típico</sub>= 95,1; %CV<sub>Típico</sub>=9,5%) y grupo III (%R<sub>Típico</sub>= 88,7; %CV<sub>Típico</sub>=12,6%). Es importante aclarar que la estimación de la precisión calculada corresponde a la repetibilidad. No obstante, de manera informativa se puede mencionar que en una validación intralaboratorio realizada con compuestos pertenecientes al grupo III, los valores de precisión entre días distan muy poco para estos HAPs, lo cual puede ser un indicativo de la fiabilidad de los métodos de saponificación, aunque cabe aclarar que se trató de una matriz y métodos de análisis totalmente distintos [160]. Por último, dado que el carácter de los compuestos supone un alto riesgo para la contaminación cruzada, se realizó la evaluación de *carryover* y la inclusión de solventes intermedios posteriores a la inyección del nivel más alto de concentración de la curva de calibración con ausencia de picos que puedan afectar muestras subsiguientes. Con el objetivo de evaluar la aplicabilidad del método de HAPs, se analizaron las mismas muestras de café tostado ya analizadas para los demás contaminantes del estudio.

La [Figura A40](#) del Anexo A muestra un ejemplo de los resultados obtenidos a través de un comparativo de las de transiciones del phenanthrene nativo (arriba) e ILIS (abajo). En la ventana se puede observar un ejemplo de la inyección de solvente después del nivel más

alto (160 ng/mL) que exhibe un *carryover* considerado normal (<0,1%). Por otro lado, resulta interesante que en la muestra M1 se observa arriba un pico para phenanthrene y abajo dos picos propios de la pareja de ILIS lo que indica, en apariencia, que se puede tratar de un resultado positivo que debe ser cuantificado y reportado pues cumple la relación de iones dentro de la tolerancia especificada para los criterios de identidad (92,0%). No obstante, la presencia del mismo pico en extracto del material considerado como “blanco” no es suficiente para hacer algún tipo de corrección por recuperación para el reporte de un resultado cuantitativo, ya que como se observa en la curva de calibración, los ensayos no se encuentran desplazados sistemáticamente, y de manera análoga a lo ocurrido en LC-APCI-HRMS, el origen del sesgo puede estar relacionado tanto con el analito, como con el ILIS. Así las cosas, los resultados evaluados como positivos en GC-MS/MS según el criterio de proporción de iones (IR), que para esta técnica establece una desviación máxima del +/-30%, fueron contrastados con hallazgos en LC-APCI-HRMS para su confirmación, siempre que se pudiera establecer un error de masa < 5ppm. El consolidado de los resultados de las muestras M1-M8 para el grupo I y II, se encuentra en la en las tablas A12 y A13, respectivamente. No se encontró ningún compuesto del grupo III en ninguna muestra. La tabla 4-3 muestra los resultados de un QC incluido para verificar el desempeño entre muestras; en donde la diferencia del cálculo de la concentración, que está indicada por el software como “exactitud”, se usa con el objetivo de detectar algún detrimento en la respuesta que pueda afectar la identificación por el criterio IR.

**Tabla 4-3:** Diferencia y proporción de transiciones del QC incluido en el análisis del lote de muestras.

Categoría	HAPs	QC (%)	IR (%)
Grupo I	Naphthalene	110,4	2,8
	Acenaphthene	110,4	29,1
	Fluorene	109,9	7,6
	Phenanthrene	110,5	9,0
Grupo II	Anthracene	105,0	14,4
	Fluoranthene	109,9	0,4
	Pyrene	111,5	0,5
	Crysene	112,5	1,8
Grupo III	Benz(a)anthracene	107,4	5,7
	Benzo(b)fluoranthene	102,2	2,6
	Benzo(a)pyrene	107,6	3,1
	Benzo[g,h,i]perylene	105,1	12,7

Además del criterio cromatográfico ( $\Delta R_t < 0,1$  min), el IR es un criterio que se cumple en la mayoría de los casos en la mayoría de los hallazgos de la [Tabla A12](#). Ahora bien, en caso de superar +/-30%, se indica como no identificado (N.I.) como ocurre para el acenaphthene

en varias muestras. Por otro lado, en el caso del fluorene y el phenanthrene, se observa que además del IR, el error de masa permanece  $< 5$  ppm como criterio de confirmación, con excepción de la muestra M8, donde no se detectó ninguna señal (N.D.) aunque la diferencia relativa del IR es un buen indicio de que sí se trata de la presencia de este compuesto. Asimismo, varios hallazgos de la [Tabla A13](#) muestran una identificación y confirmación bajo los criterios de identidad, a pesar de que en varias muestras se encuentra por debajo del límite de cuantificación ( $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). Se puede destacar que, para las muestras provenientes de España (M3) y Suecia (M4) el pyrene alcanza valores de 5,6 y  $13,6 \mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente, y se trata de un hallazgo identificado por GC-MS/MS y confirmado por LC-APCI-HRMS.

En general, la presencia de HAPs en café tostado es atípica, quizás porque se considera que se encuentran a bajas concentraciones y no se suelen incluir en análisis de rutina, o precisamente, porque su determinación no es obligatoria; pero, en efecto, se pueden correlacionar resultados con un monitoreo reciente realizado en múltiples muestras de café vietnamita [161], que consistentemente mostró valores muy altos de naphthalene (cerca de  $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), y además de hallazgos frecuentes a concentraciones inferiores de anthracene, pyrene, fluorene, phenanthrene y benz(a) anthracene que fueron los mismos compuestos encontrados en las muestras analizadas en este estudio. Vale la pena mencionar que al final de las secuencias de validación y del análisis de muestras de diferentes variedades, tipo de tueste, y origen; y como parte del mantenimiento rutinario, se realizó el cambio del inserto de vidrio y se evaluó el estado del equipo haciendo uso de una solución de prueba que, a través de la evaluación de diferentes parámetros, ayuda a determinar si el desempeño es adecuado para realizar inyecciones posteriores, o por el contrario, se requiere del cambio de consumibles del cromatógrafo o de una limpieza profunda que requiera apagar el instrumento, por ejemplo para limpiar la fuente de ionización del espectrómetro de masas. La [Figura A41](#) muestra el TIC de la adquisición donde a simple vista se puede ver que no hubo detrimento en la respuesta (evaluada con el HCB), la resolución del par crítico  $\beta\text{-HCH}/\gamma\text{-HCH}$  es adecuada, hay una buena simetría del chlorpyrifos, y como uno de los factores más sensible al estado del instrumento, la degradación del 4,4-DDT fue  $<< 30\%$ , indicando que la inyección de múltiples muestras no tiene tanto impacto en el equipo a comparación de los anteriores métodos probados.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

Los sistemas nacionales y mundiales de vigilancia de la inocuidad de los alimentos deben hacer frente a peligros emergentes e insospechados, normalmente mediante el seguimiento, la inversión y el apoyo a la investigación para futuros desafíos. Se investigó la posible presencia de micotoxinas enmascaradas durante el almacenamiento de tipos semisecos de muestras seleccionadas de café del Tolima, pero no se encontró evidencia de formas modificadas de OTA. Por otro lado, el café contaminado artificialmente bajo procesamiento térmico reveló la formación de conjugados de glucósidos mediante el uso de técnicas SIL, sin embargo, no se encontraron cantidades en muestras reales de café comercial proveniente de países donde generalmente se agrega azúcar/sacarosa durante el tostado (torrefacto). Vale la pena señalar que el café es una matriz excepcionalmente compleja. Este desafío requiere técnicas robustas para verificar datos, analizar y extraer información durante el desarrollo del método que ayuden a explorar la composición de los extractos. La extracción de OTA del café verde se puede lograr con alta eficiencia utilizando una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) y un paso de limpieza usando PSA por dSPE. Entre las ventajas que puede ofrecer la miniaturización de los métodos, el uso de menores cantidades de solventes y evitar el desperdicio de adsorbentes es por un lado conveniente, pero también respetuoso con el medio ambiente. Además, este formato pequeño también permite el uso de cantidades significativamente reducidas de los estándares marcados con isótopos que son muy costosos, éstos son insumos utilizados para la cuantificación en este tipo de aplicaciones de forma rutinaria y normalmente en cantidades que terminan siendo desperdiciadas. Mediante una estrategia analítica paralela, la extracción acuosa de la AA y la extracción orgánica de la OTA (AcOEt) se realizan en un solo paso de extracción simultáneo. Esta partición también se utiliza como un paso de limpieza clave que evita los lípidos de la fase acuosa que, de otro modo, podrían dificultar la adsorción de la AA en el

paso dSPME “en tubo” sobre el adsorbente PSA. El diseño del método permitió ampliar el alcance a otros contaminantes, como plaguicidas y micotoxinas, mediante el uso de una única porción analítica y la misma ejecución en lugar de procedimientos separados ya que todos estos son riesgos que pueden afectar la inocuidad química de las muestras de café del Tolima. En resumen, el método permite cuantificar 186 compuestos a 10 µg/kg, 226 a 5 µg/kg y la AA a 200 µg/kg para un total de 414 moléculas, con recuperación (70%-120%) y precisión aceptable (RSD<20%), lo que hace que esta estrategia sea significativamente más rápida y rentable.

Con relación a la determinación de HAPs, la extracción con AcOEt, la transesterificación y el análisis por GC-MS/MS fue, en definitiva, la mejor manera de realizar la cuantificación este tipo de compuestos, incluyendo el grupo PAH4 que son los compuestos normalmente regulados en alimentos. Aunque no hay valores detallados para café tostado según la legislación vigente, el uso de este método puede ayudar como un procedimiento sencillo, rápido y limpio, y, al mismo tiempo, se podría incluir como una herramienta eficaz de análisis en programas de monitoreo si los HAPs son incluidos en próximas actualizaciones de la normatividad internacional.

## 5.2 Recomendaciones

Los resultados de la evaluación de las respuestas mostraron que, a diferencia de las demás micotoxinas evaluadas (aflatoxinas y toxinas de alternaria), la OTA exhibe un aumento particularmente alto empleando ACN como base de la fase móvil orgánica cuando se emplea la interfaz APCI. Por lo tanto, vale la pena revisar si esta diferencia posiblemente se debe a la eficiencia de la evaporación que aumenta la sensibilidad, o si, por el contrario, se trata de una disminución debida a condiciones no optimizadas en el uso de MeOH en esta modalidad de ionización.

Dado que algunos compuestos pueden sufrir degradación (p. e.: hidrólisis) durante la extracción simultánea orgánico-acuosa, nuevos estudios podrían investigar sistemas de amortiguación de pH como una alternativa para mejorar las recuperaciones de compuestos polares que pueden exhibir inestabilidad o baja sensibilidad. Las pruebas futuras deberían tener en cuenta que hay que evitar la interferencia con la adsorción en dSPME y la compatibilidad con el sistema de medición (p.e.: LC-HRMS).

El uso de LC-HRMS brinda la posibilidad de aumentar la selectividad del método de HAPs, incluso para extractos sin limpieza extensiva como se evidenció en los cromatogramas obtenidos haciendo uso de la sonda APCI. No obstante, la sensibilidad está muy limitada por la competencia de los compuestos de la matriz en el mecanismo de ionización secundario que da lugar a restringir su uso a la confirmación de hallazgos, pero con una sensibilidad limitada. Por lo tanto, en trabajos futuros se sugiere que se hagan pruebas empleando la interfaz de fotoionización a presión atmosférica (APPI) que ha demostrado ser más eficiente que la interfaz APCI, siendo un mecanismo más adecuado para la determinación de este tipo de compuestos, y es incluso promisorio para las especies más ligeras que probablemente son más polares o tienen menor afinidad protónica lo que dificulta su ionización por APCI [158]. Además, en caso de que surja interés por determinar especies más pesadas, la interfaz de ionización láser a presión atmosférica (APLI) puede ser una alternativa que es incluso más sensible que GC-MS/MS [162], aunque es muy poco común y sin un uso extensivo en equipos comerciales.

Un método de extracción amigable con el medio ambiente basado en el uso de AcOEt es una estrategia efectiva, no obstante, la posibilidad de contar con el uso de mecanismos de extracción asistida alternativos al ultrasonido puede ayudar a mejorar el rendimiento. En particular, el uso de dispositivos comerciales para la extracción líquida presurizada (PLE) no solo ayudaría a mejorar la extracción de moléculas pequeñas, sino también, promover la extracción de compuestos más pesados, generalmente más tóxicos, como los HAPs de más anillos que podrían estar presentes en las muestras de manera inadvertida.

Debido a la tendencia de los HAPs a la acumulación en las superficies, se recomienda el uso de una limpieza química abrasiva que puede ser implementada en el sistema 7000D en adelante. El uso concurrente de un flujo de hidrógeno sobre el *ion volume* (JetClean™) puede ayudar mantener las superficies de la fuente de ionización limpias por más tiempo para evitar mantenimientos que obligan a apagar el instrumento y que puede retrasar la operación del laboratorio.



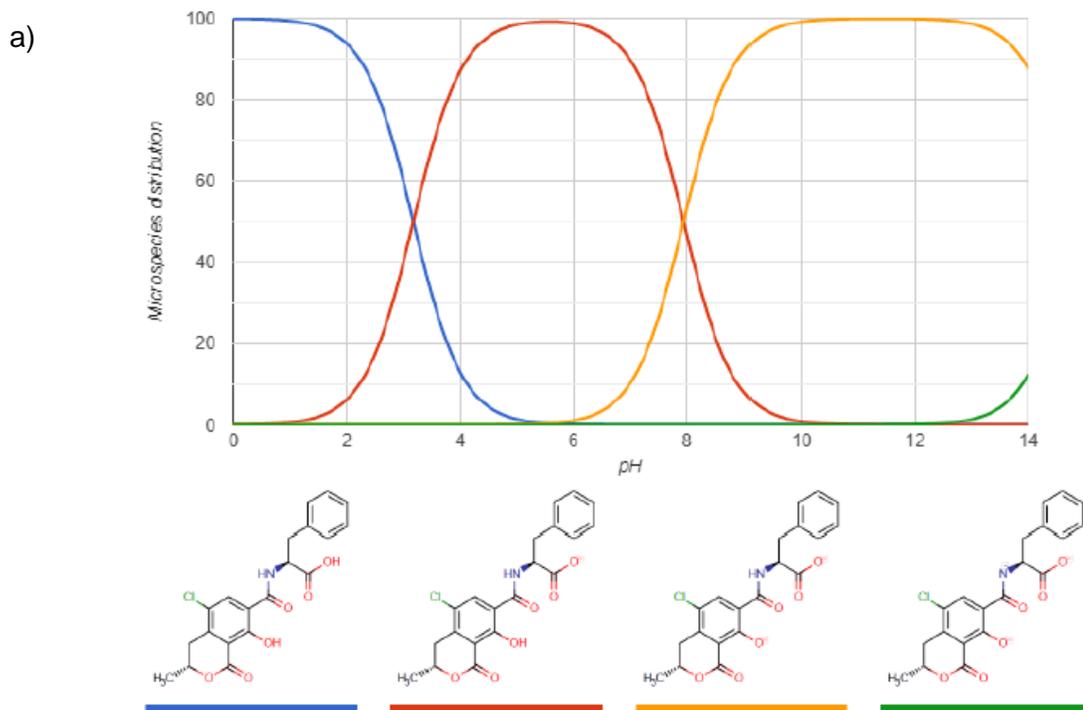
## A. Anexo: Figuras y Tablas Suplementarias

<b>Listado de Figuras y Tablas suplementarias</b>	<b>Pág.</b>
Figura A1.....	77
Figura A2.....	78
Figura A3.....	79
Figura A4.....	80
Figura A5.....	81
Figura A6.....	82
Figura A7.....	83
Figura A8.....	84
Figura A9.....	85
Figura A10 .....	86
Figura A11 .....	87
Figura A12 .....	88
Figura A13 .....	89
Figura A14 .....	90
Figura A15 .....	91
Figura A16 .....	92
Figura A17 .....	93
Figura A18 .....	94
Figura A19 .....	95
Figura A20 .....	96
Figura A21 .....	97
Figura A22 .....	98
Figura A23 .....	99

---

<b>Listado de Figuras y Tablas suplementarias (Continuación)</b>	<b>Pág.</b>
Figura A24 .....	100
Figura A25 .....	101
Figura A26 .....	102
Figura A27 .....	103
Figura A28 .....	104
Figura A29 .....	105
Figura A30 .....	106
Figura A31 .....	107
Figura A32 .....	109
Figura A33 .....	110
Figura A34 .....	110
Figura A35 .....	111
Figura A36 .....	111
Figura A37 .....	112
Figura A38 .....	113
Figura A39 .....	114
Figura A40 .....	115
Figura A41 .....	116
Tabla A1 .....	117
Tabla A2.....	119
Tabla A3.....	120
Tabla A4.....	123
Tabla A5.....	124
Tabla A6.....	142
Tabla A7.....	143
Tabla A8.....	145
Tabla A9.....	146
Tabla A10.....	147
Tabla A11.....	148
Tabla A12.....	149
Tabla A13.....	150

**Figura A1:** Evaluación preliminar de la eficiencia de ionización para un grupo de micotoxinas con respecto al solvente y la presencia de matriz como la relación de las pendientes de curvas de calibración o efecto sobre la ionización (%IE). a) Diagrama de distribución de especies de OTA en función del pH elaborado con tecnología de [www.chemicalize.org](http://www.chemicalize.org), [163], b) Evaluación de HESI vs APCI en Solvente, MeOH como referencia. c) Evaluación de HESI vs APCI, solvente vs. matriz. Aflatoxin B (AFB), Altartoxin (ATX), Alternariol (AOH), Alternariol 9-methyl ether (AME). Resultados presentados en el Producto 1.



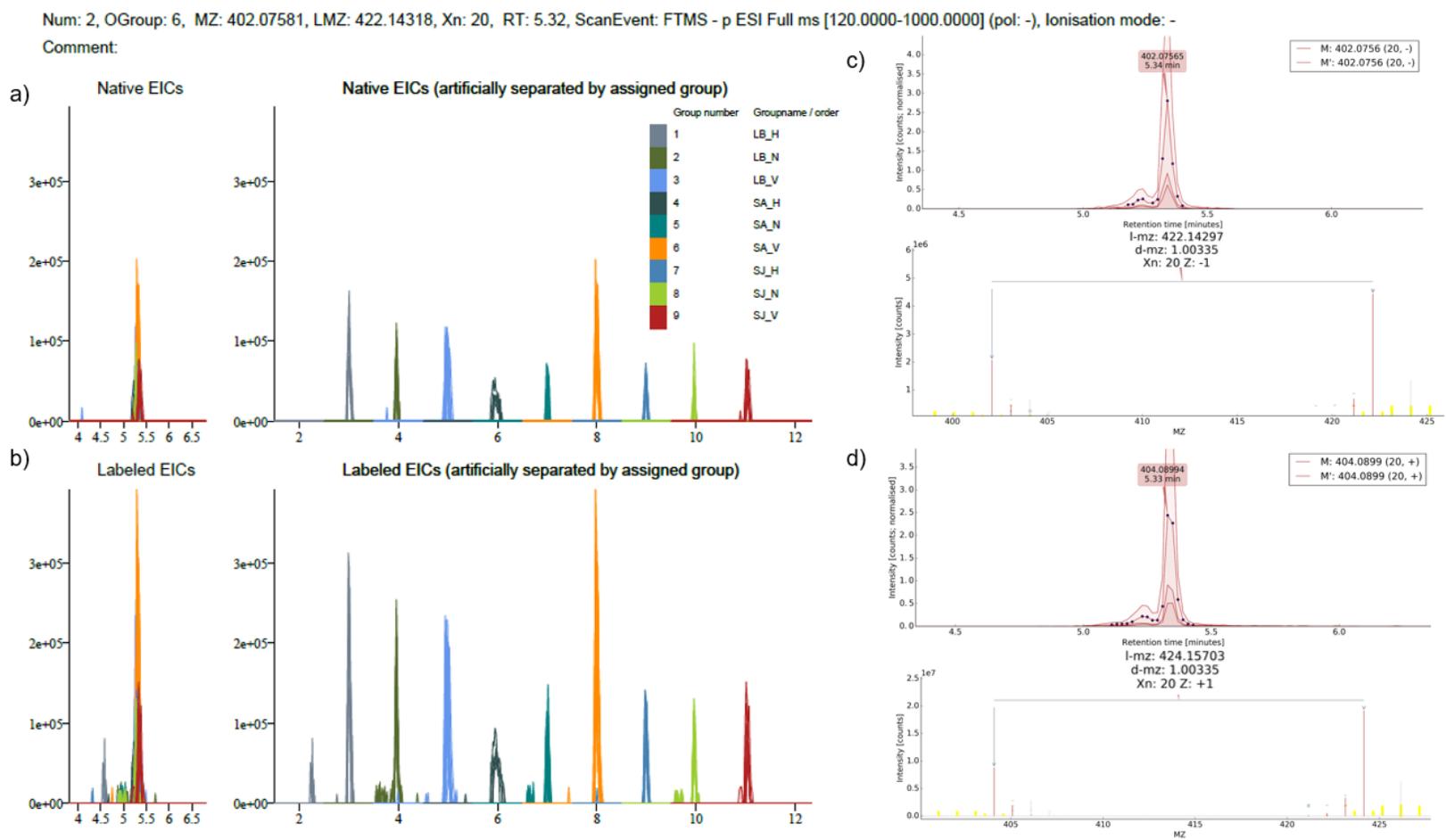
b)

Molecule	HESI	APCI
AFB2	▼68%	■94%
AFB1	▼65%	■96%
OTA+	▼37%	▲687%
OTA-	▼37%	▲497%
ATX1	▼43%	▼73%
AOH	▼42%	▲129%
AME	▼47%	▼78%

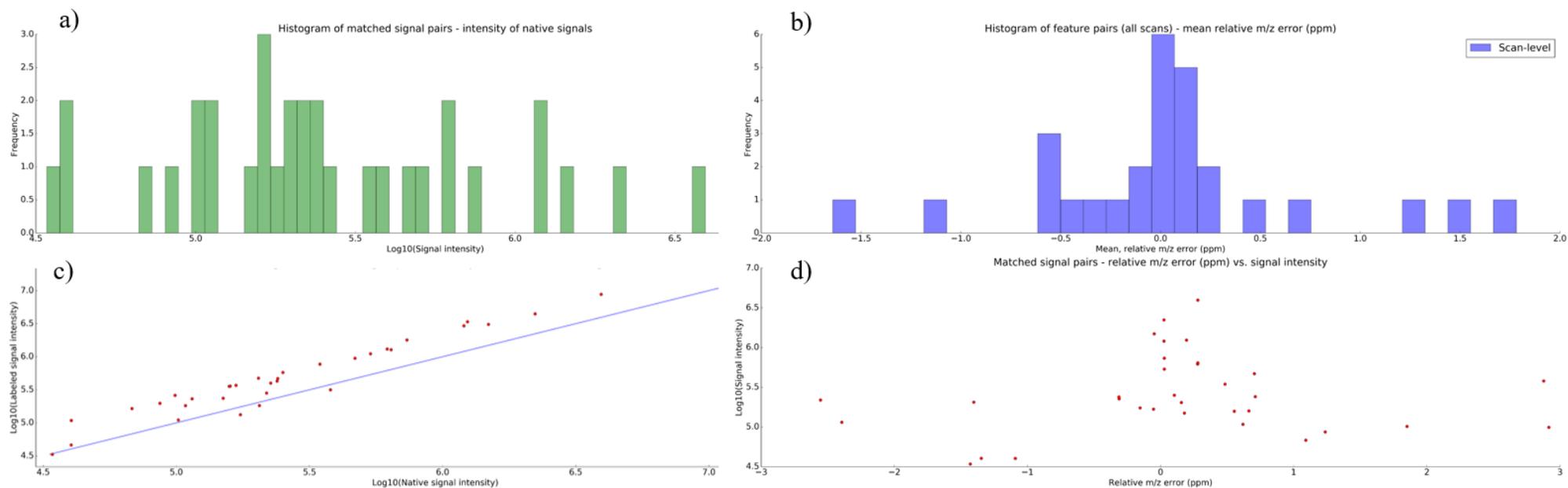
c)

Molecule	MeOH		ACN	
	HESI	APCI	HESI	APCI
AFB2	▼54%	▲119%	■97%	▲140%
AFB1	▼63%	▲129%	■87%	▲141%
OTA+	■85%	▲234%	■103%	▲203%
OTA-	■96%	▲390%	■98%	▲166%
ATX1	▲143%	▲168%	■94%	▲145%
AOH	▲111%	▲301%	■83%	▲164%
AME	▲126%	▲171%	■99%	▲132%

**Figura A2:** *Feature pair* de  $^{13}\text{C}$ -U-OTA con/sin marcar (*native*) en granos de café tratados de diferentes regiones (LB, SA, SJ), tipos (H, N, V) y un control de calidad de OTA de 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . (a) Superposición de cromatogramas de iones extraídos (EIC) con una ventana de extracción de masa (MEW) de 5 ppm de *feature pairs* que muestran una distancia de 20 carbonos ( $X_n:20$ ) en polaridad negativa. Se representa la forma sin marcar (a) y la marcada con  $^{13}\text{C}$  (b). Detalle del control de calidad para el *feature group* (arriba) y el espectro de masas (abajo) que muestra la distancia del patrón isotópico de la señal marcada con OTA del par de iones en (c) negativo  $[\text{M}-\text{H}]^-$  y (d) positivo  $[\text{M}+\text{H}]^+$  adquiridos en *Full Scan* a 70000 FWHM en modo de intercambio de polaridad y analizados con el software MetExtract II



**Figura A3:** Ejemplo de las métricas de MetExtract II para los cromatogramas de iones extraídos (EIC) del *feature pair*  $^{13}\text{C}$ -U-OTA con/sin marcar (*native*) que mostraron una distancia de 20 carbonos ( $X_n:20$ ) en las muestras que fueron fortificadas y analizadas después de un periodo de seis meses de almacenamiento en condiciones ambientales controladas. (a) Histograma de pares coincidentes vs. intensidad de señal; (b) Histograma de *feature pairs* y error de masa relativa media; (c) representación de la intensidad de las señales nativas y marcadas que muestran una correlación lineal bastante buena, y (d) distribución del error de masa y la intensidad de las señales donde la mayoría de las señales de alta intensidad tienen menos error de masa.



**Figura A4:** Modelo ternario utilizado para explorar el efecto entre mezclas de solventes de extracción ACN, MeOH, H<sub>2</sub>O y el área de OTA a partir de cromatogramas de iones extraídos (EIC) para el conjunto de muestras de la región de San Juan (SJ) fortificadas a 5 µg/kg. (a) Salida de la función R MixModel (paquete *mixexp*) utilizando un ajuste al modelo tipo 4 descrito en Lawson y Wilden (2016), efectos significativos para las interacciones de dos vías y un término de interacción de tres vías que al límite dificultan el análisis del efecto de los términos interdependientes individuales sobre la respuesta OTA; sin embargo, la mejora en el R<sup>2</sup> sobre otros tipos de ajuste indica que el modelo explica alrededor del 69% de la variabilidad de la respuesta de la OTA; (b) La mayoría de los residuos estudentizados permanecen en un rango cerrado, se encuentran distribuidos aleatoriamente entre +/-2 y no muestran ninguna tendencia visible; (c) el gráfico ternario muestra las combinaciones seleccionadas en la región restringida del diseño D-óptimo (puntos rojos), el área amarilla y las líneas de contorno ayudan a identificar las combinaciones que generan una respuesta de la OTA más alta.

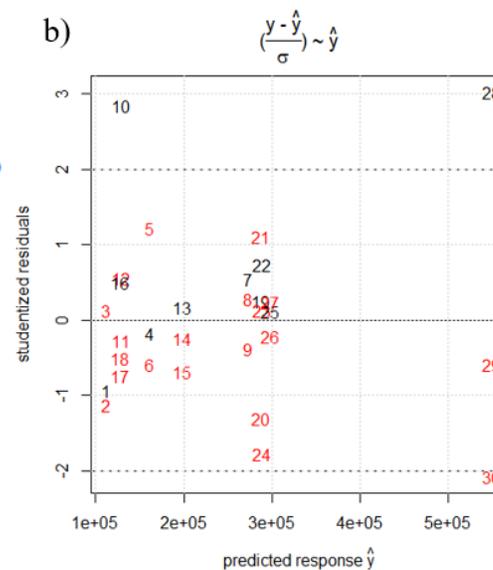
a)

```
> res <- MixModel(x, "OTA",
+               mixcomps = c("ACN", "MeOH", "H2O"), model = 4)
```

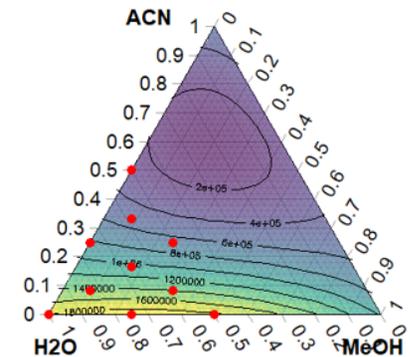
	coefficients	Std.err	t.value	Prob
ACN	1795799.5	558574.77	3.2149671	3.838823e-03
MeOH	981538.1	558562.19	1.7572584	9.217915e-02
H2O	548492.1	52050.68	10.5376554	2.820293e-10
MeOH:ACN	1714186.6	7398241.09	0.2317019	8.188186e-01
H2O:ACN	-3533915.9	1048101.71	-3.3717299	2.632688e-03
MeOH:H2O	-1913523.7	1048075.65	-1.8257496	8.090050e-02
MeOH:H2O:ACN	-8542385.8	13818832.55	-0.6181699	5.425370e-01

Residual standard error: 93262.81 on 23 degrees of freedom  
Corrected Multiple R-squared: 0.6964569

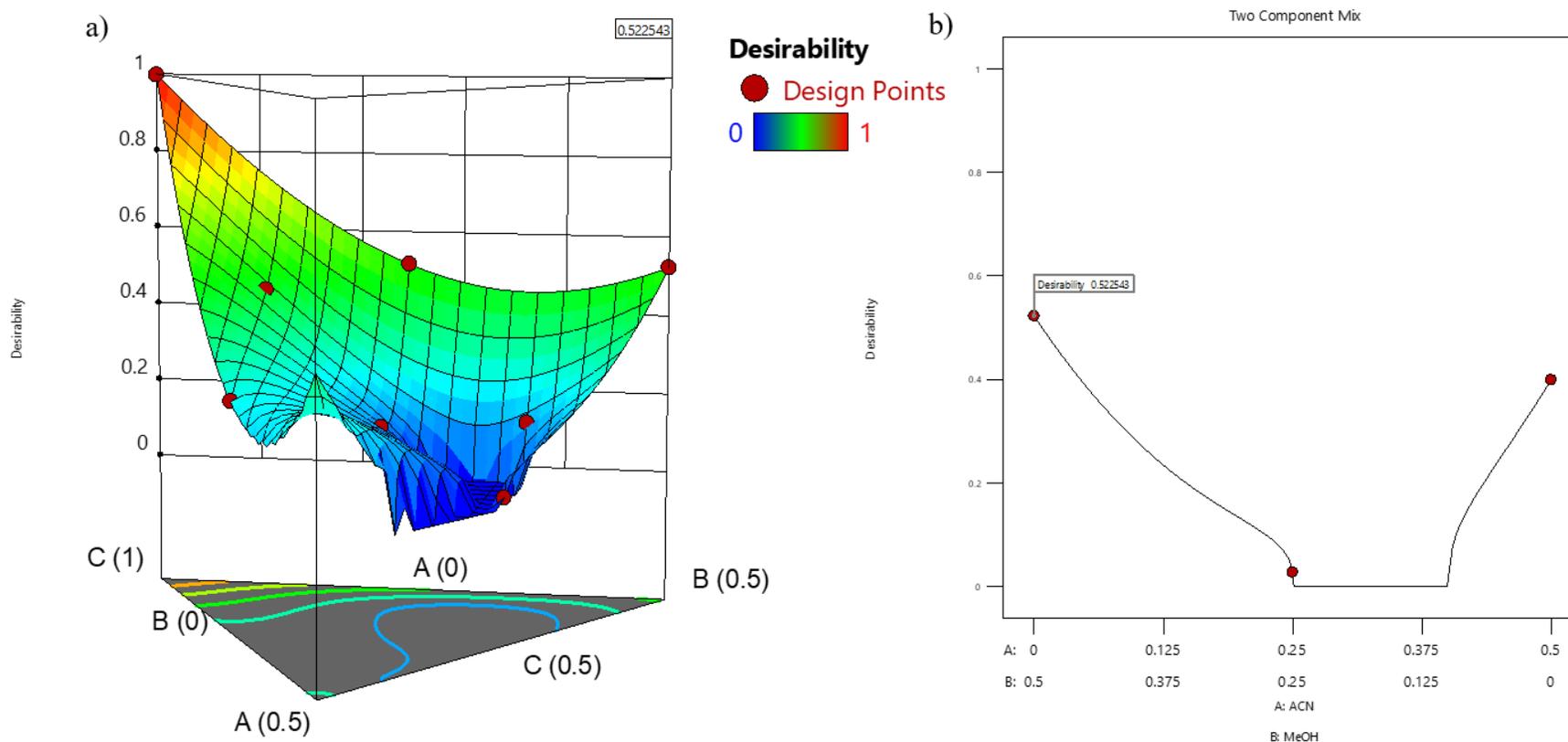
b)



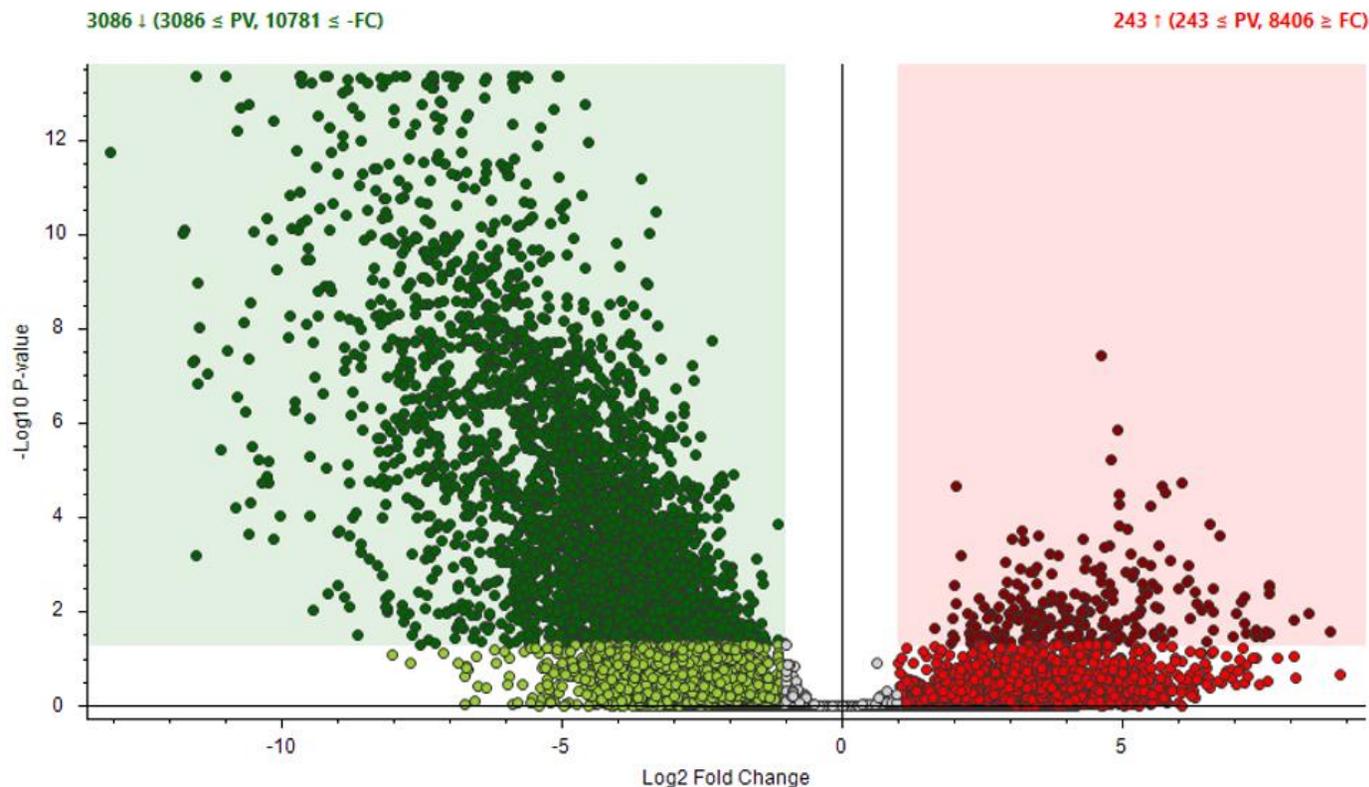
c)



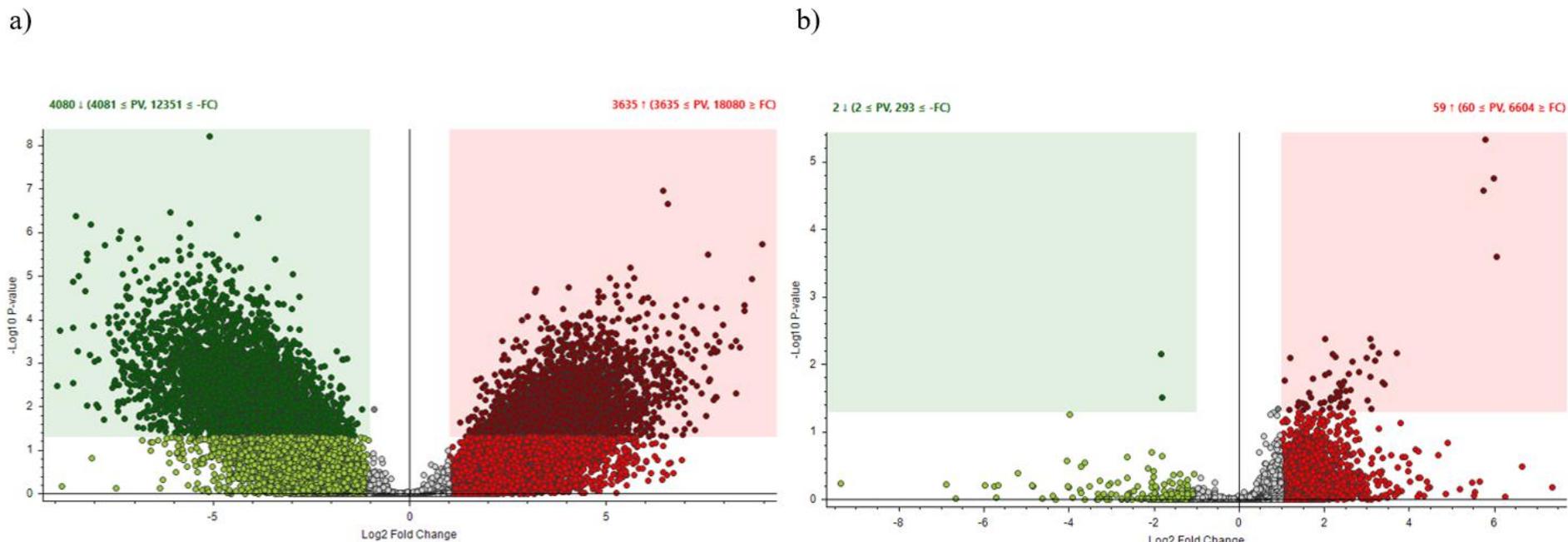
**Figura A5:** Representaciones de las mezclas del diseño D-Optimal con los solventes de extracción ACN, MeOH, H<sub>2</sub>O y el área de la OTA obtenida de los cromatogramas de iones extraídos (EIC) para el conjunto de muestras de la región de San Juan (SJ) fortificada a 5 µg/kg. (a) Gráfico 3D de la superficie de respuesta del modelo ternario que muestra la posición relativa de la respuesta OTA modelada (eje y) y las mezclas probadas (puntos rojos); (b) corte transversal que muestra una mezcla de dos componentes (ACN y MeOH, H<sub>2</sub>O 0,5) donde la bandera muestra la composición de la fracción de mayor deseabilidad para MeOH (~0,52) calculada con el software Design Expert V.12.



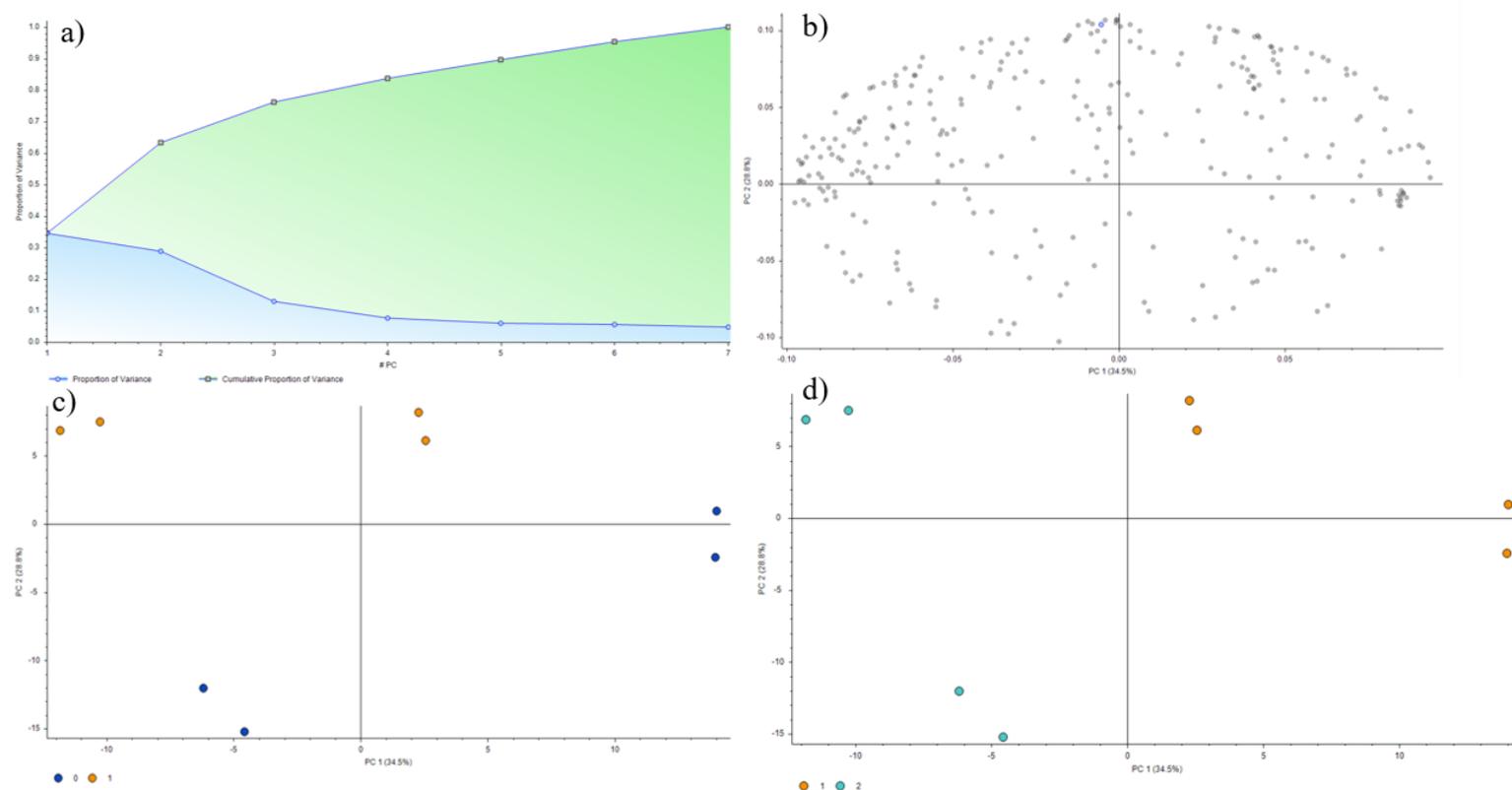
**Figura A6:** Diagrama de dispersión del análisis diferencial entre las muestras de la región de San Juan (SJ) extraídas utilizando como ejemplo la mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1 (muestra 'referencia') y una mezcla alternativa ACN/H<sub>2</sub>O 1:1 (muestra de prueba). Cada punto muestra compuestos encontrados después de usar una estrategia de filtrado de datos utilizando los siguientes criterios: el  $\log_2$  del cambio o *fold-change* (FC) entre las dos muestras comparadas a lo largo del eje horizontal y el  $-\log_{10}$  del valor p (PV) del cambio a lo largo del eje vertical. Los resultados del ANOVA se clasifican en colores: compuestos que muestran menos del doble de abundancia entre las muestras o un cambio  $< 2$  (gris), los compuestos que muestran una proporción menor que la referencia (verde) y una proporción mayor que la referencia (rojo). Las regiones sombreadas indican compuestos con evidencia de diferencias que exceden el umbral de significancia elegido (valor de  $p < 0,05$ ). Los compuestos se distribuyen a lo largo del eje y, cubriendo todo el rango de valores p de 0 a 1 y mostrando  $-\log_{10}$  para mayor claridad, es decir, desde  $-\log_{10} 1 = 0$  y hasta  $-\log_{10} 0 = \text{Infinito}$ .



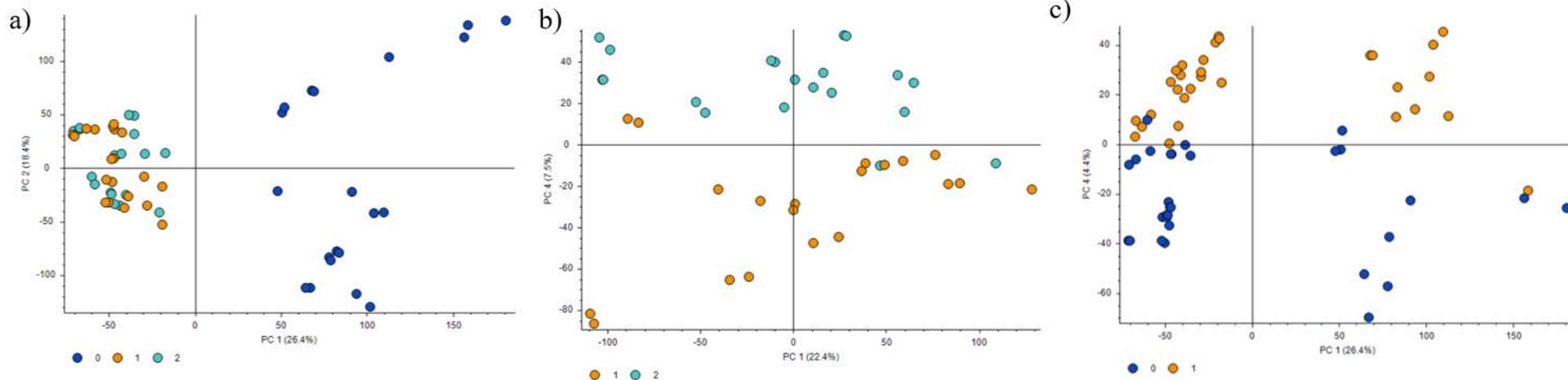
**Figura A7:** Diagrama de dispersión como ejemplo del análisis diferencial entre las muestras de la región de San Juan (SJ) extraídas con la mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1 comparando el tipo de café vs. café lavado: (a) Café en grano natural y (b) Café *honey*. Los resultados del ANOVA mostraron que en el caso del café natural la mayoría de los compuestos presentaron proporciones que superan significativamente un cambio del doble o *fold change*, tanto en mayor (rojo), como en menor proporción (verde) frente a los valores encontrados en la referencia, mientras que solo unos pocos compuestos (2 inferiores y 59 superiores) mostraron significancia en comparación con el tipo *honey*, lo cual indica una mayor similitud en el perfil de la matriz.



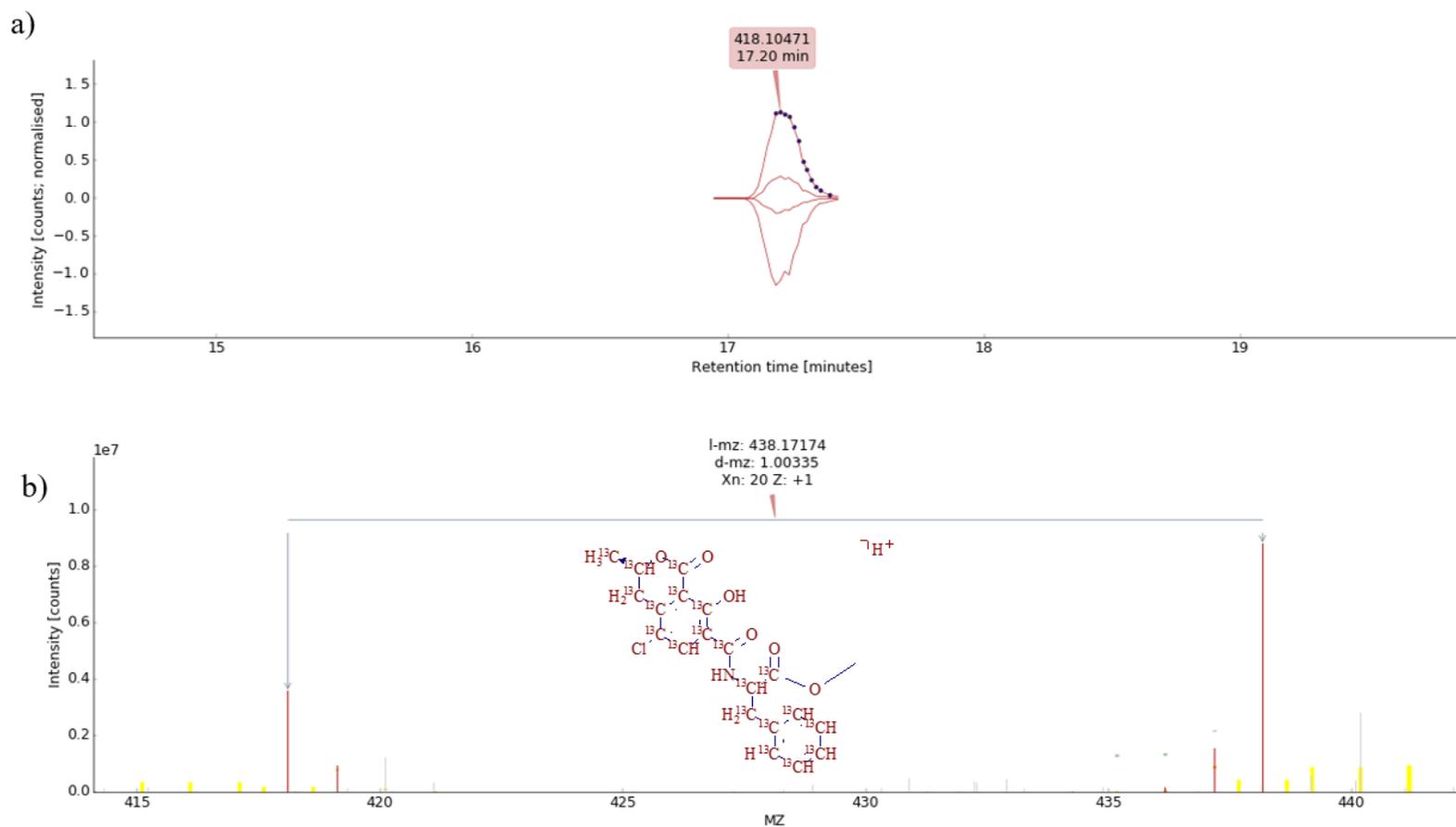
**Figura A8:** Resultados del Análisis de Componentes Principales (PCA) para el diseño experimental que involucra la acidificación del solvente de extracción con ácido fórmico (0: sin ácido, 1: con ácido) y el tipo de adsorbente utilizado en el paso de limpieza (1: PSA, 2: ENV+) como factores de tratamiento en un arreglo completamente aleatorio de muestras de café tostado. Las respuestas de los compuestos encontrados después de la estrategia de filtrado de datos se transforman en un conjunto artificial de variables independientes o Componentes Principales (PC) que pueden explicar la variación entre las respuestas de los compuestos originales en las diferentes circunstancias. (a) Gráfico de varianza que muestra el porcentaje y el porcentaje acumulado de varianza que representa cada PC, que entre los PC1 y PC2 tienen la mayor contribución y explican más del 60% de la variabilidad total. (b) *Loadings plot* que muestra la relación entre las variables PC1 y PC2 en función de su proximidad relativa; la mayoría de los compuestos están distribuidos en lados opuestos y muestran una correlación negativa, aunque algunos agrupamientos indican también similitudes. (c) *Scores plot* que muestra las réplicas de muestras agrupadas pero una separación entre las muestras extraídas con y sin el solvente acidificado en diferentes colores a lo largo del PC2 (eje y) que explica casi el 29%, (d) En este caso el código de colores muestra las muestras que utilizaron diferente adsorbente de limpieza en azul claro y amarillo que se encuentran en lados opuestos del PC1 (eje x) lo que explica el 34,5% de la variación total.



**Figura A9:** Scores plot de un diseño experimental extendido aplicado a muestras de café tostado de varias marcas que involucró la acidificación del solvente de extracción con ácido fórmico (0: sin ácido, 1: con ácido) y el paso de limpieza (0: sin limpieza, 1: PSA, 2: ENV+) como factores de tratamiento en un arreglo completamente aleatorio. (a) Scores plot que muestra dos grupos a lo largo del eje x, PC1, lo que explica la mayor parte de la variación total que separa las muestras sin limpieza de las muestras sometidas a cualquiera de las opciones de limpieza en un grupo al lado izquierdo, (b) Scores plot centrado solo en la separación de muestras con diferentes adsorbentes de limpieza en azul claro y amarillo usando el PC 4. Aunque explica solo el 7,5% de la varianza, los grupos se reubicen en lados opuestos del eje y, (c) Se logró la separación de las muestras extraídas sin ácido fórmico en azul oscuro y con ácido en amarillo a lo largo del PC 4 aunque explicando sólo el 4,4% de la variación total sobre todo el conjunto de muestras.

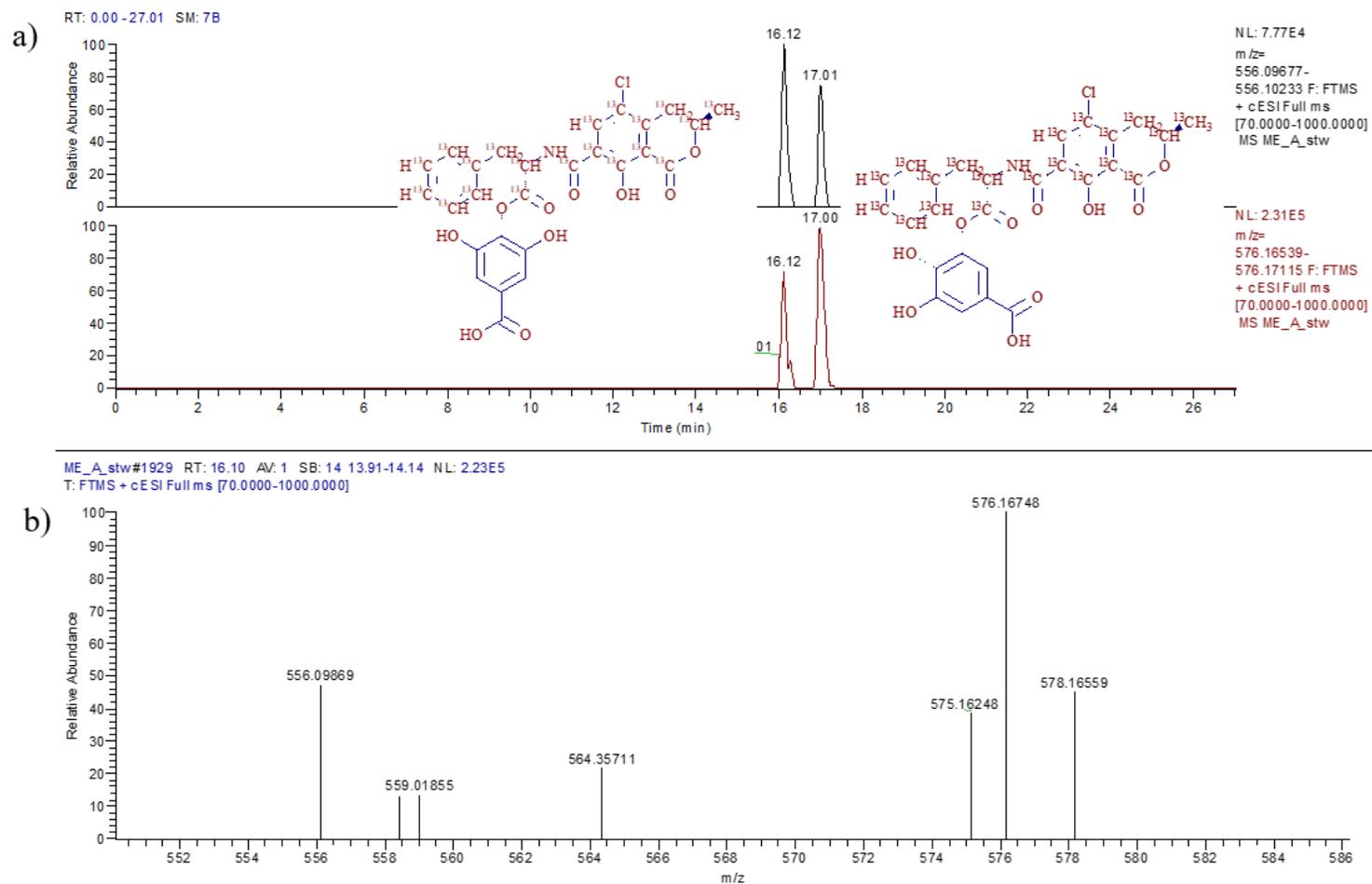


**Figura A10:** *Feature pair* de la condensación de la  $^{13}\text{C}$ -U-OTA con/sin carbonos marcados con metanol que forma parte de la mezcla de solventes de la preparación para el vial de inyección. El éster metílico de la especie nativa incluye 21 carbonos en la fórmula molecular  $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{ClNO}_6$  y se identificó en  $m/z$ : 418,1047 ( $\Delta m/m$ : 1,17 ppm), su *feature* correspondiente consiste en la OTA uniformemente marcada más 1 carbono nativo adicional del MeOH. Por lo tanto, se muestra como el par está separado solo por 20 carbonos ( $X_n$ : 20) que se encontró a  $m/z$ : 438.1717, ( $\Delta m/m$ : 1.23 ppm).

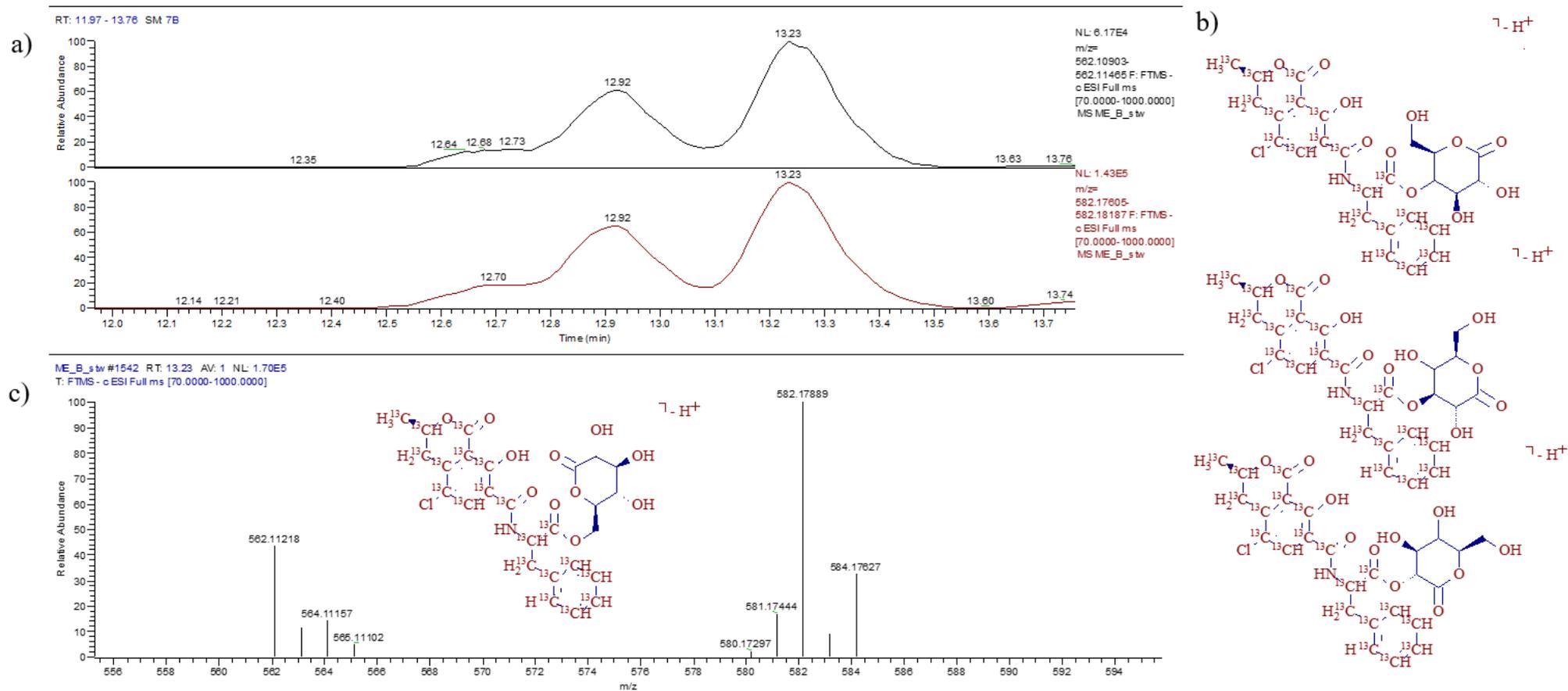




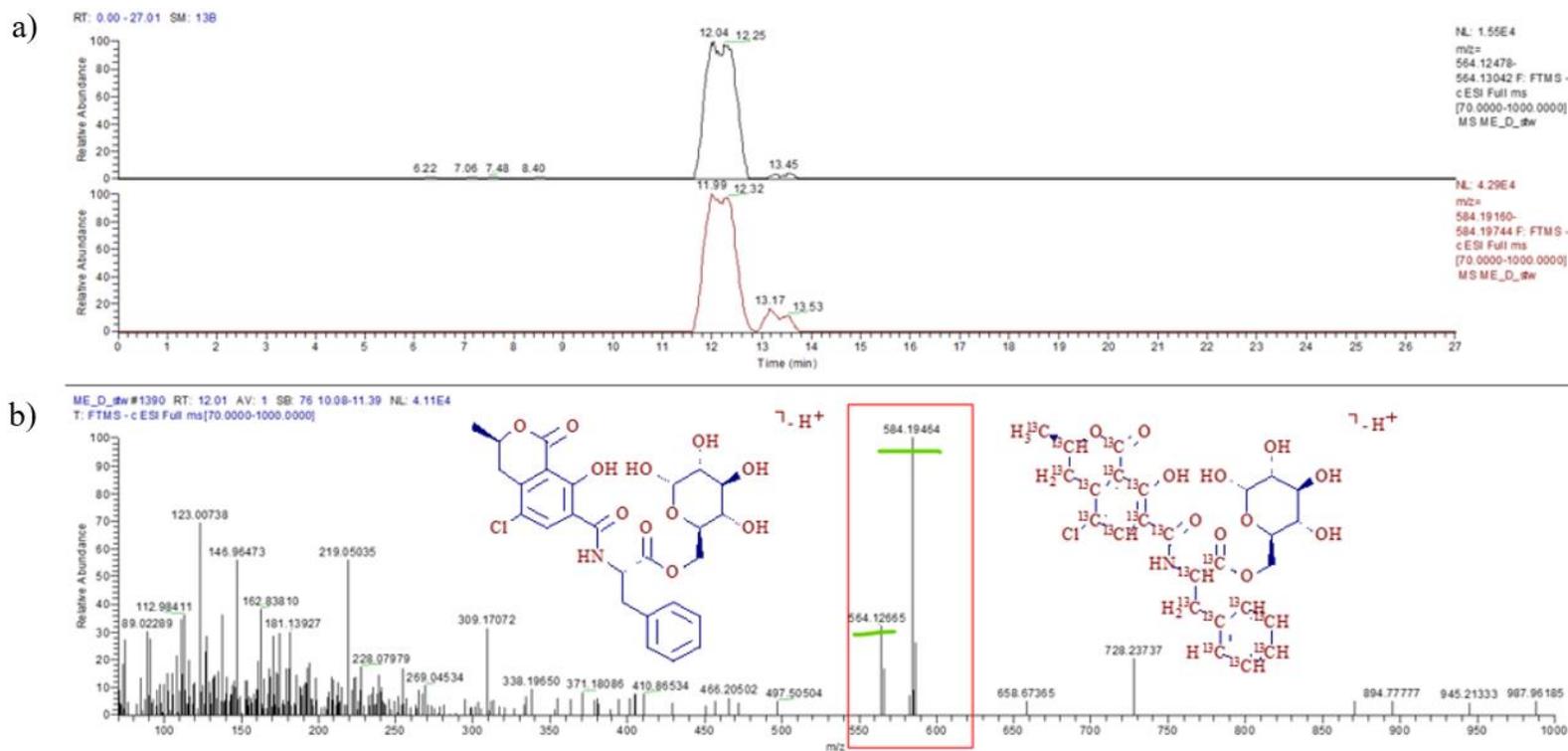
**Figura A12:** Evidencia de la reacción de la OTA con un polifenol aromático modelo (galic acid) que muestra la formación de isómeros posicionales. a) Dos picos se relacionan con la condensación de la OTA con los grupos hidroxilo en las posiciones meta y para que generen las estructuras isoméricas para ambos productos del éster arílico encontrados a los 16,12 y 17,01 min con la estructura nativa (arriba) y marcada (abajo) b) espectro de referencia a las 16,10 min caracterizado por masas prominentes en m/z: 556,09869 y 576,16748, respectivamente.



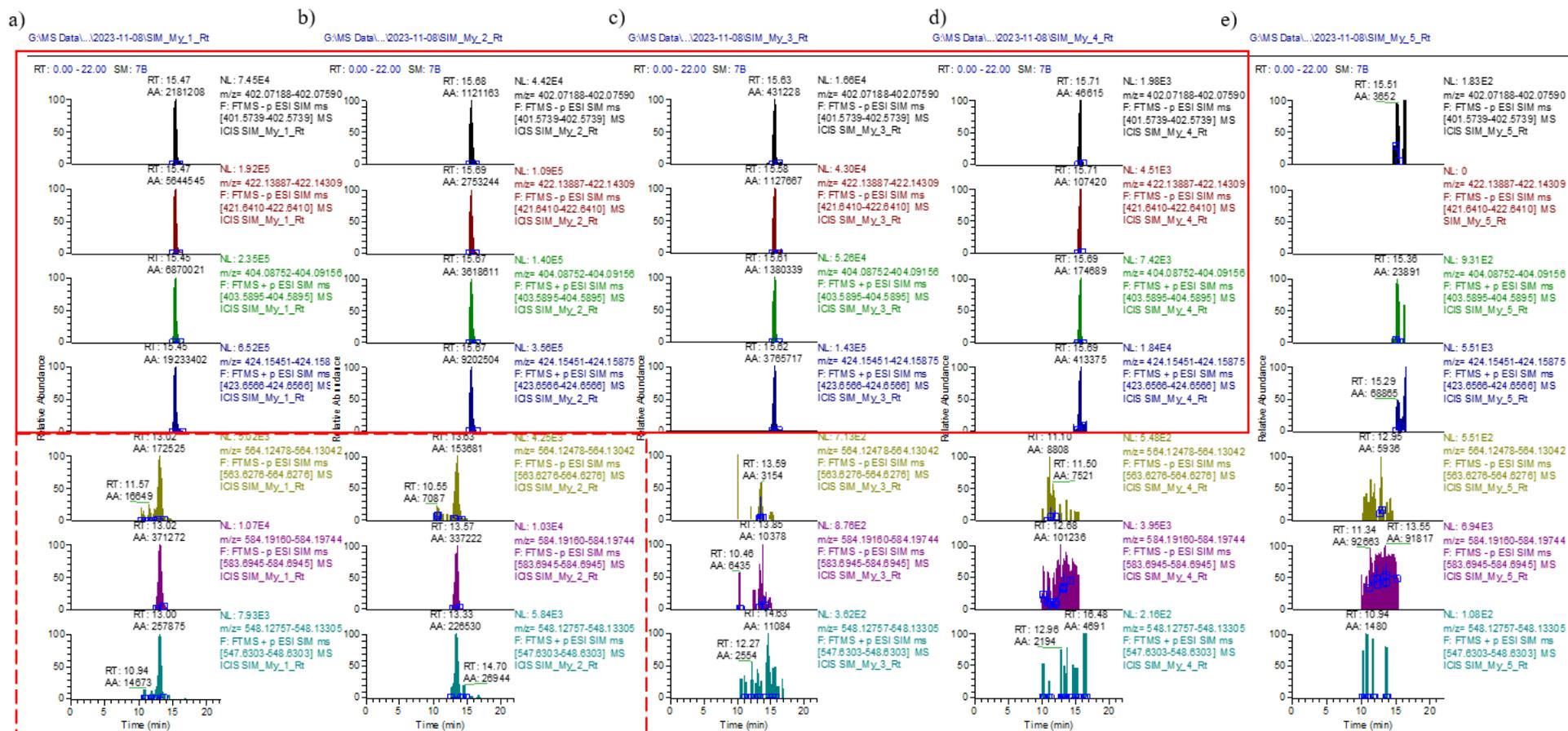
**Figura A13:** Evidencia de la reacción de la OTA con D (+) -glucono-1,5-lactone como modelo de un compuesto cíclico similar a un monosacárido tipo hexosa. a) El conjunto de picos indica la formación de varios isómeros posicionales relacionados b) la condensación con grupos hidroxilo disponibles producen diferentes isómeros c) condensación preferencial con el alcohol primario hacia un glucósido (22 → 6') como se muestra en el espectro del pico más alto a los 13,23 min, caracterizado por masas prominentes de los ésteres de la <sup>13</sup>C-OTA nativa y marcada a m/z: 562,11218 y 582,17889, respectivamente.



**Figura A14:** Experimento de calentamiento de la OTA con sacarosa como disacárido modelo parecido a lo que ocurre en el procesamiento del torrefacto. Posiblemente después de una descomposición térmica, se puede dar la reacción de la OTA con la glucosa derivada de la sacarosa. a) Los EIC de la adquisición en FS en polaridad negativa muestran un pico que indica la formación del glucósido (OTA-glu) correspondiente a  $m/z$ : 564,12665. Por el contrario, no se encontró evidencia de condensación con la sacarosa ni con el residuo de fructosa. b) El espectro a 12,01 min relacionado con un solo pico podría reflejar una condensación preferencial con el alcohol primario hacia una estructura de glucósido (22  $\rightarrow$  6') representada en ambos lados del cuadrado rojo que muestra el éster nativo y marcado con  $^{13}\text{C}$ -OTA en  $m/z$ : 564.12665 y 584.19464, respectivamente.

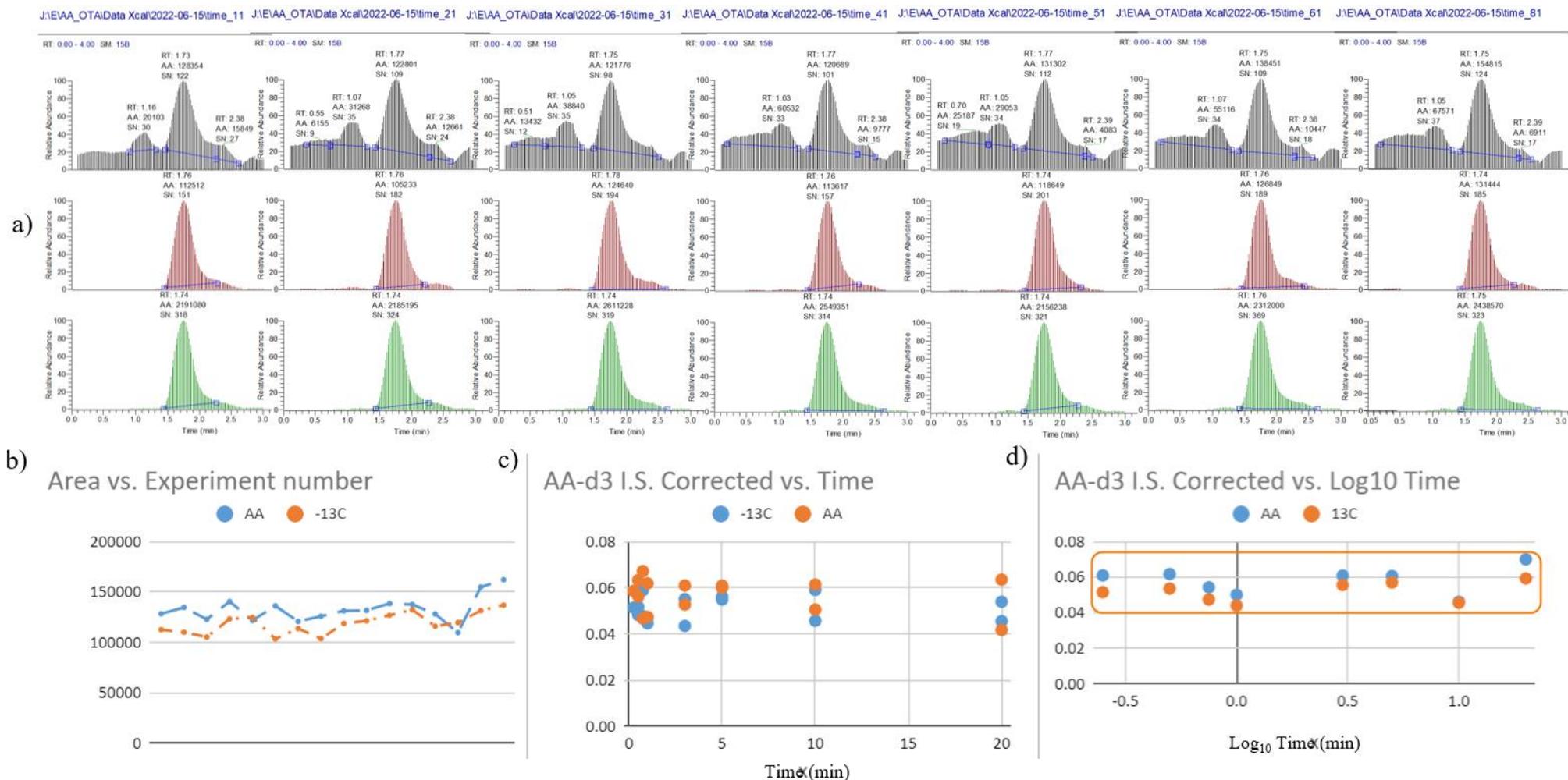


**Figura A15:** Efecto de la temperatura sobre el enmascaramiento de la OTA durante la simulación del proceso de torrefacto. Los tratamientos fueron identificados respectivamente con indicadores consecutivos en el nombre del archivo, se llevaron a cabo cinco experimentos de calentamiento a) 150°C, b) 175°C, c) 200°C, d) 225°C y e) 250°C seguidos de la extracción y análisis utilizando un método SIM, una variante del Método 1 que logra la mayor sensibilidad. El cuadrado rojo muestra los EIC de la OTA, polaridad negativa (negro: nativo y rojo: marcado) y positiva (verde: nativo y azul: marcado). No queda OTA en el experimento a la temperatura más alta. El cuadrado de líneas discontinuas muestra trazas características del producto de condensación de OTA-glu que no está presente en los experimentos a temperaturas superiores a 185 °C, que es la temperatura de descomposición de la sacarosa.

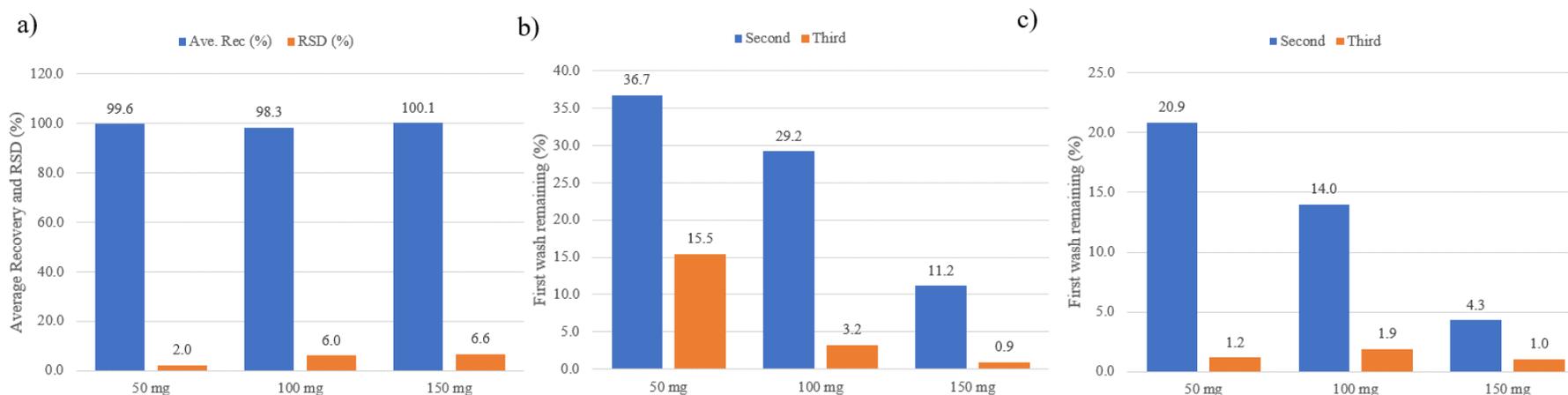




**Figura A17:** Estudio del tiempo de adsorción de AA no marcada, AA-<sup>13</sup>C fortificada a 200 µg/kg (negro y rojo). AA-d3 fortificada después de la extracción como estándar interno I.S. (verde) utilizando el procedimiento dSPME 'en tubo' en café tostado. (a) Cromatogramas de iones extraídos (EIC) con una ventana de extracción de masa (MEW) de 5 ppm de una configuración de 35000 FWHM @ 200 m/z para un modo de Monitoreo de reacción paralela (PRM) para evaluar el tiempo de adsorción (min), de izquierda a derecha (0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 5, 10 y 20) min. Sólo se muestra el primer experimento replica #1 de cada tiempo. (b) Área de la AA, de la AA-<sup>13</sup>C y número de experimento. (c) AA y AA-<sup>13</sup>C corregidos con I.S. vs. tiempo (min). (d) AA y <sup>13</sup>C corregidos con I.S. vs. Log<sub>10</sub> tiempo (min).

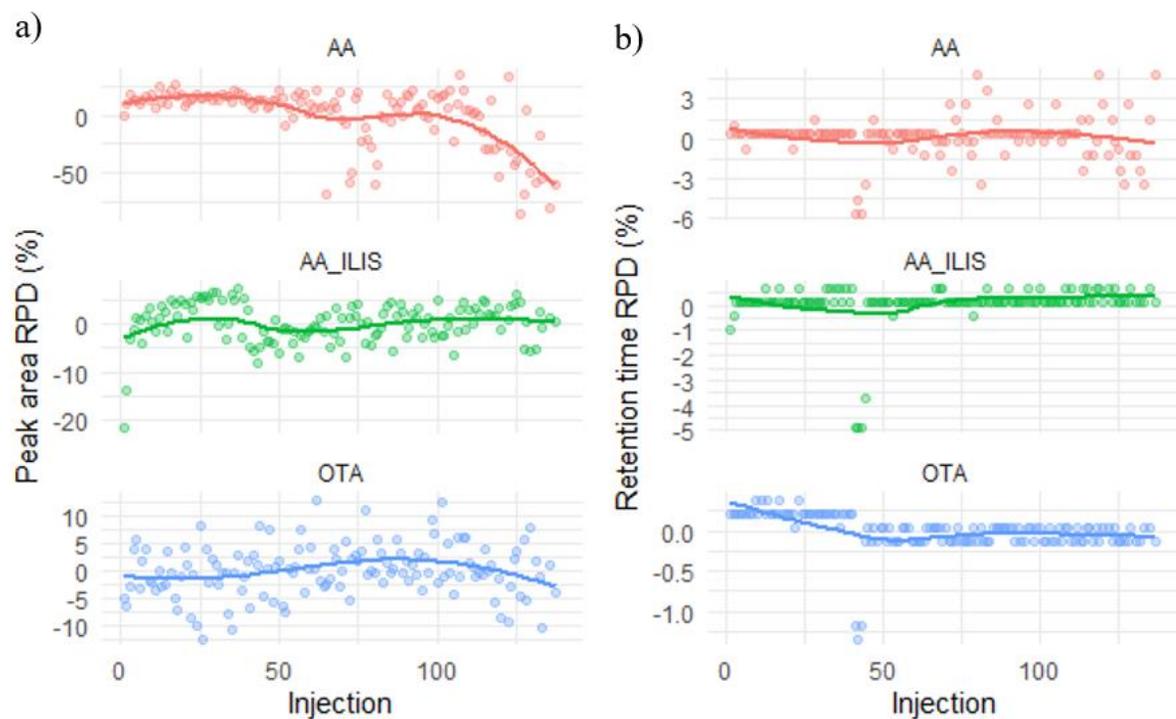


**Figura A18:** Evaluación del procedimiento dSPME 'en tubo' en muestras fortificadas con 200 µg/kg. (a) Cantidad relativa de AA en solución antes y después del proceso de adsorción (Recuperación después de la adsorción y centrifugación), corregida con estándar interno I.S. (n=3) y probada usando diferentes cantidades de adsorbente (b) Cantidad relativa de AA en lavados consecutivos después de la primera elución (remanente en % relativo al primer lavado) y probada usando diferentes cantidades de adsorbente, (c) Cantidad relativa de AA en lavados consecutivos después de la primera elución (remanente en % con respecto a la primera) pero probada usando una relación solvente de lavado vs. adsorbente de 2:1 en cada una de las diferentes cantidades de adsorbente.

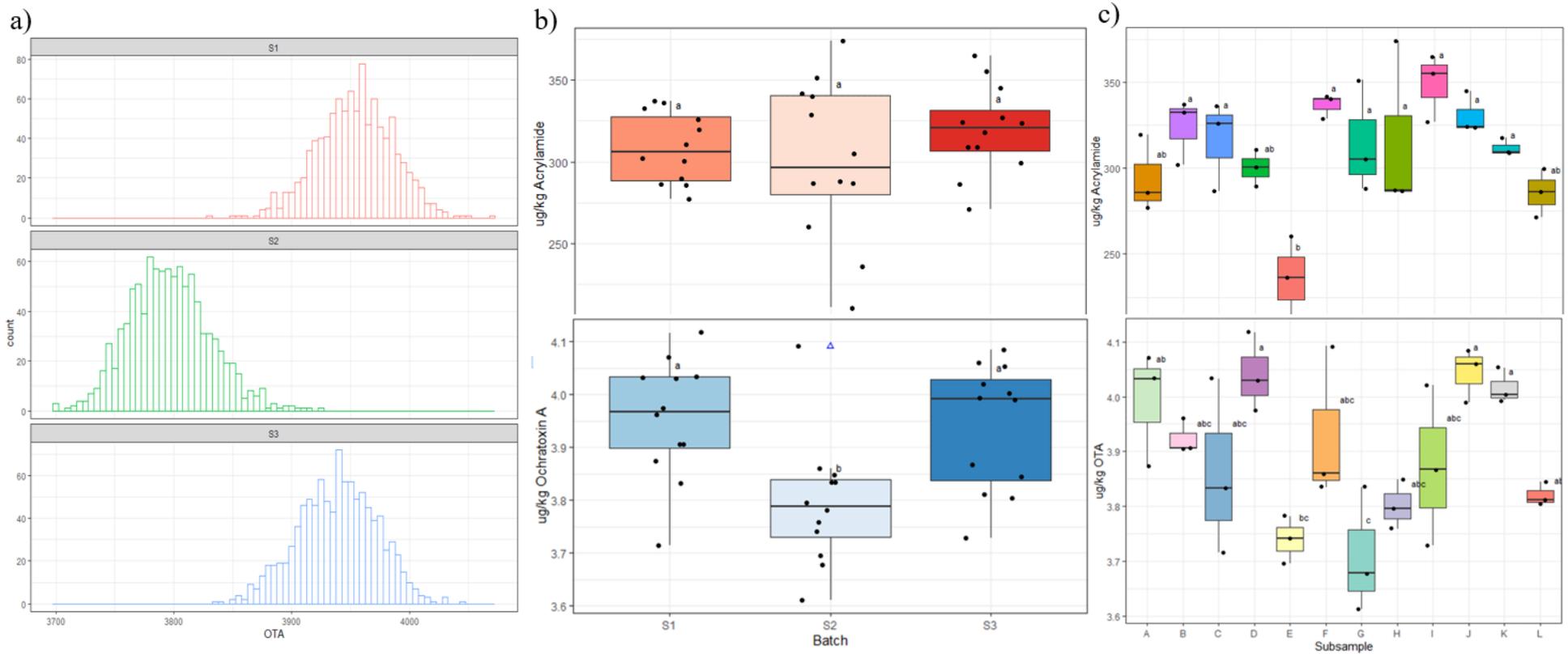


Nota: También se evaluó un lavado en serie y este experimento mostró que cuanto mayor es el volumen de elución, menos AA queda remanente para otro lavado. Además, hay que tener en cuenta que el volumen de lavado aumenta con la cantidad de adsorbente para mantener la misma relación adsorbente-líquido. Por tanto, cuanto mayor sea el volumen, menor será la concentración final debido al factor de dilución. Adicionalmente, se realizó el mismo experimento, pero utilizando una proporción de adsorbente: lavado de 2:1 para comprobar si había alguna mejora, pero se encontró el mismo comportamiento. Por consiguiente, se mantuvo la proporción 1:1 y no se consideró hacer ningún lavado secuencial sino mantener sólo la primera elución. Por razones prácticas, las cantidades de adsorbente se ajustaron conforme a las dimensiones del filtro y para dejar suficiente espacio para que el vortex, lo cual definió los valores en la Figura 3-1. Vale la pena señalar que, al igual que para los métodos SPE que utilizan un paso de limpieza (generalmente con un cartucho multimodo C18) que se requiere antes de la retención del AA sobre el ENV+, la adsorción en este estudio no se ve obstaculizada por los lípidos del café gracias al uso del AcOEt que actúa como agente desengrasante de la fase acuosa antes de que se someta al procedimiento dSPME.

**Figura A19:** Prueba de resistencia para el procedimiento dSPME 'en tubo' en muestras durante una secuencia de 100 ejecuciones durante el fin de semana, seguida de una nueva secuencia (40 ejecuciones) que comienza con una inyección de solvente, sin realizar procedimiento de mantenimiento. Diferencia porcentual relativa (RPD) para el área (a) y el tiempo de retención (b). Modo de adquisición de monitoreo de reacción paralela (PRM) en una muestra enriquecida con 200 µg/kg para AA, AA-d<sub>3</sub> (AA\_ILIS) y 5 µg/kg para OTA.



**Figura A20:** Estudio de homogeneidad basado en un diseño anidado de dos etapas con lotes (S) para homogeneidad entre unidades y submuestras (A-L) para homogeneidad dentro de las unidades. (a) Histograma de valores *bootstrap* (1000) de cada uno de los lotes en el estudio de la OTA que mostró una distribución bimodal aparente. Los límites de confianza de las distribuciones de los lotes S1 y S3 se superponen, no así en el caso de S2, lo que indica que los lotes pueden diferir más allá de la dispersión experimental. (b) Diagramas de caja que muestran diferencias significativas calculadas mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey entre los lotes. (c) Los resultados de AA muestran que las submuestras pertenecen a grupos indistintos independientemente del lote, excepto la submuestra E. Los resultados de OTA indican que las muestras individuales pertenecen a grupos indistintos independientemente del lote, excepto las submuestras E y G que no comparten el mismo grupo (letra a).



**Figura A21:** Representación esquemática de la configuración del modo de adquisición *Full Scan* - Monitoreo "amplio" de reacciones paralelas (FS-wPRM). (a) Vista del Editor de métodos en el software ThermoScientific™ Tune™, la pestaña Configuración del experimento muestra unos recuadros para los diferentes experimentos disponibles. Además de todas las configuraciones importantes en la barra lateral derecha para los cuadros Full MS y PRM, es clave crear una lista de inclusión que siga un esquema de ventanas amplias que van cambiando en segmentos de tiempo. (b) Diagrama de dispersión que muestra la distribución de la masa molecular del ion original (m/z) y el tiempo de retención previamente comprobado de cada compuesto (punto y nombre). Observe que las ventanas rojas se van desplazando a través del tiempo hacia valores m/z más altos para cubrir la mayoría de los compuestos, para su confirmación (evento MS2 en el FS-wPRM).

a)

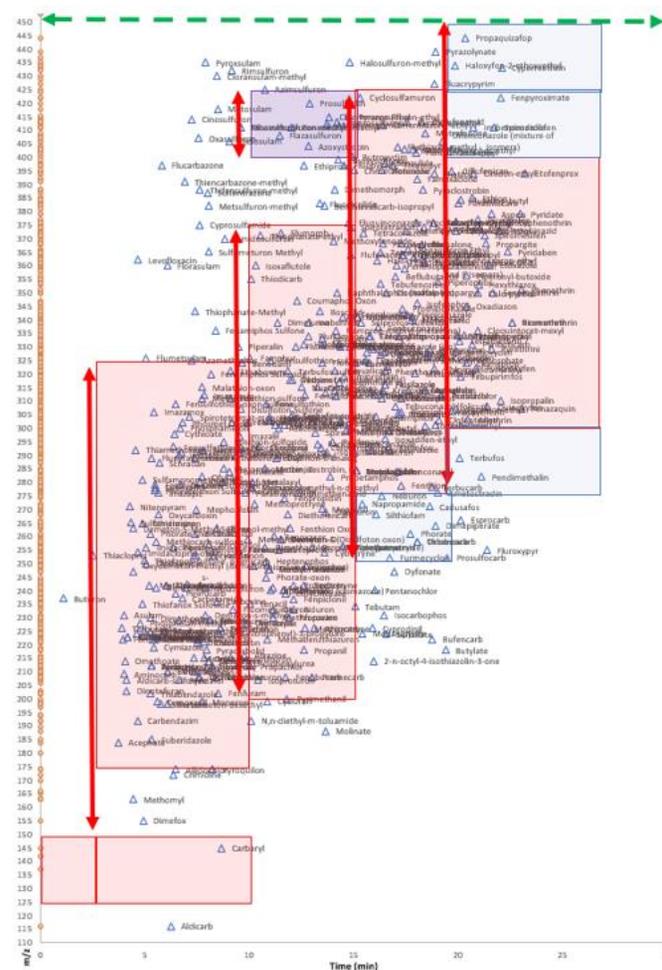
**Experiments**

- General
- Full MS
- SIM
- PRM
- Full MS - AIF
- Full MS - vDIA
- AIF

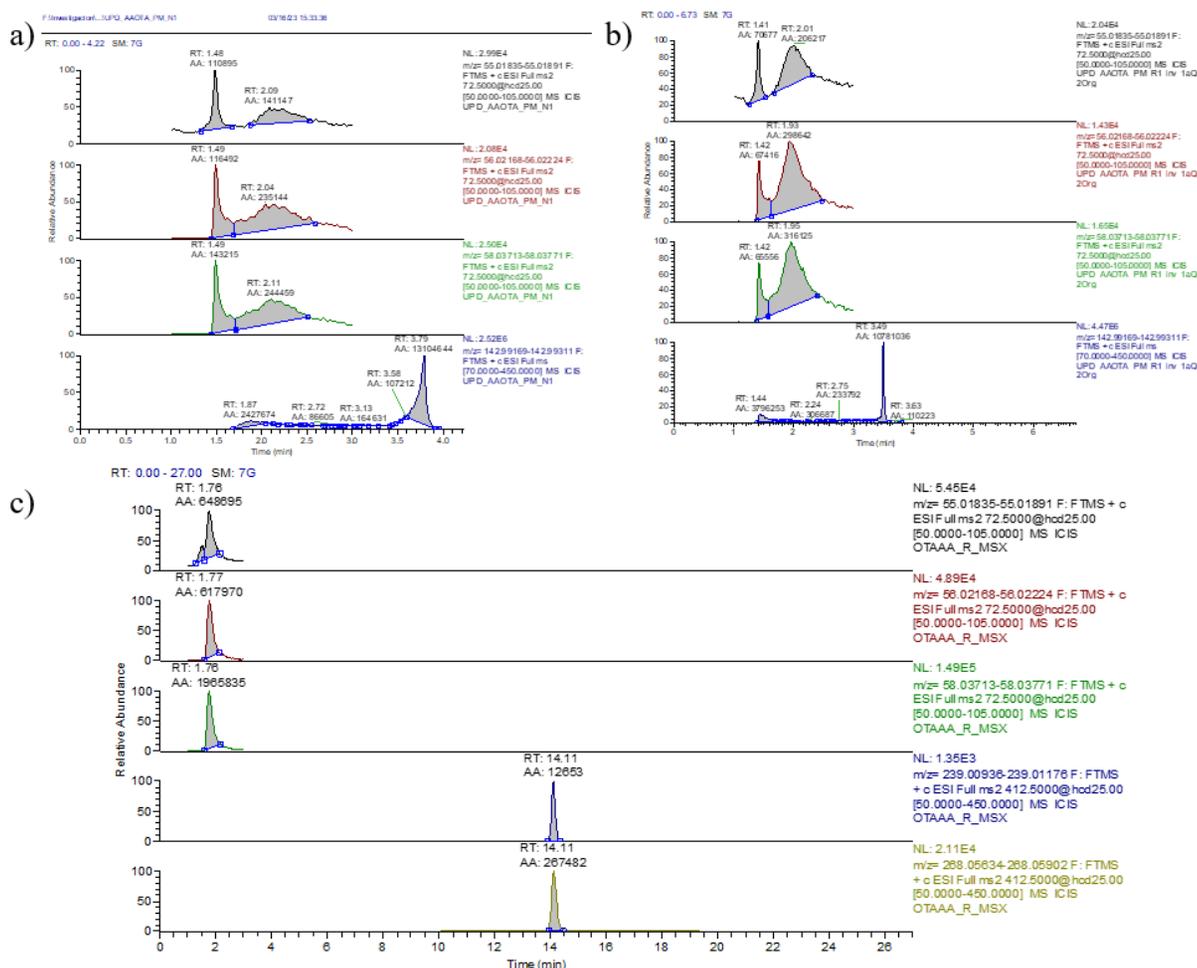
**Method editor — Inclusion List**

File	Edit	Help	Mass [m/z]	Formula [M]	Species	CS [z]	Polarity	Start [min]	End [min]	(N)CE
▶			72.50000				Positive	1.00	3.00	25
			137.50000				Positive	1.00	3.00	25
			137.50000				Positive	3.00	10.00	25
			187.50000				Positive	3.00	10.00	25
			212.50000				Positive	3.00	10.00	25
			237.50000				Positive	3.00	10.00	25
			262.50000				Positive	3.00	10.00	25
			287.50000				Positive	3.00	10.00	25
			312.50000				Positive	3.00	10.00	25
			212.50000				Positive	10.00	15.00	25
			237.50000				Positive	10.00	15.00	25
			262.50000				Positive	10.00	15.00	25
			287.50000				Positive	10.00	15.00	25
			312.50000				Positive	10.00	15.00 </td <td>25</td>	25

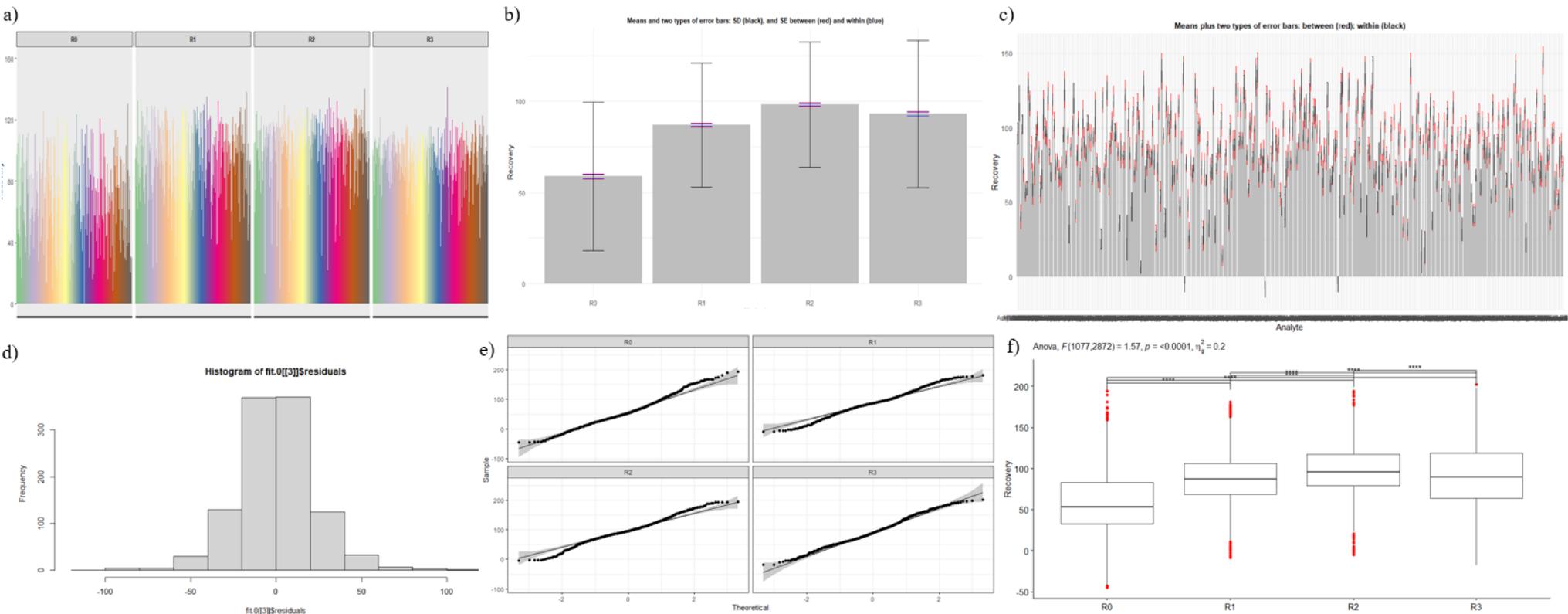
b)



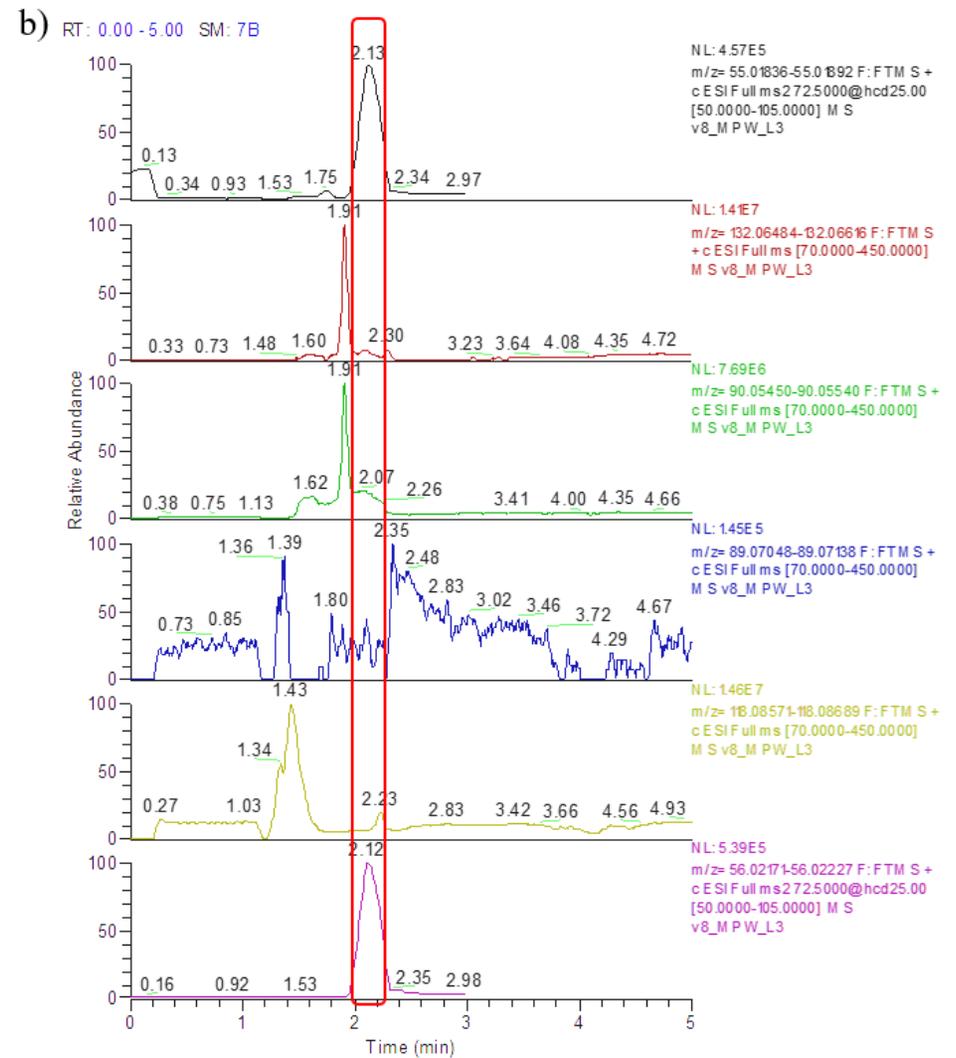
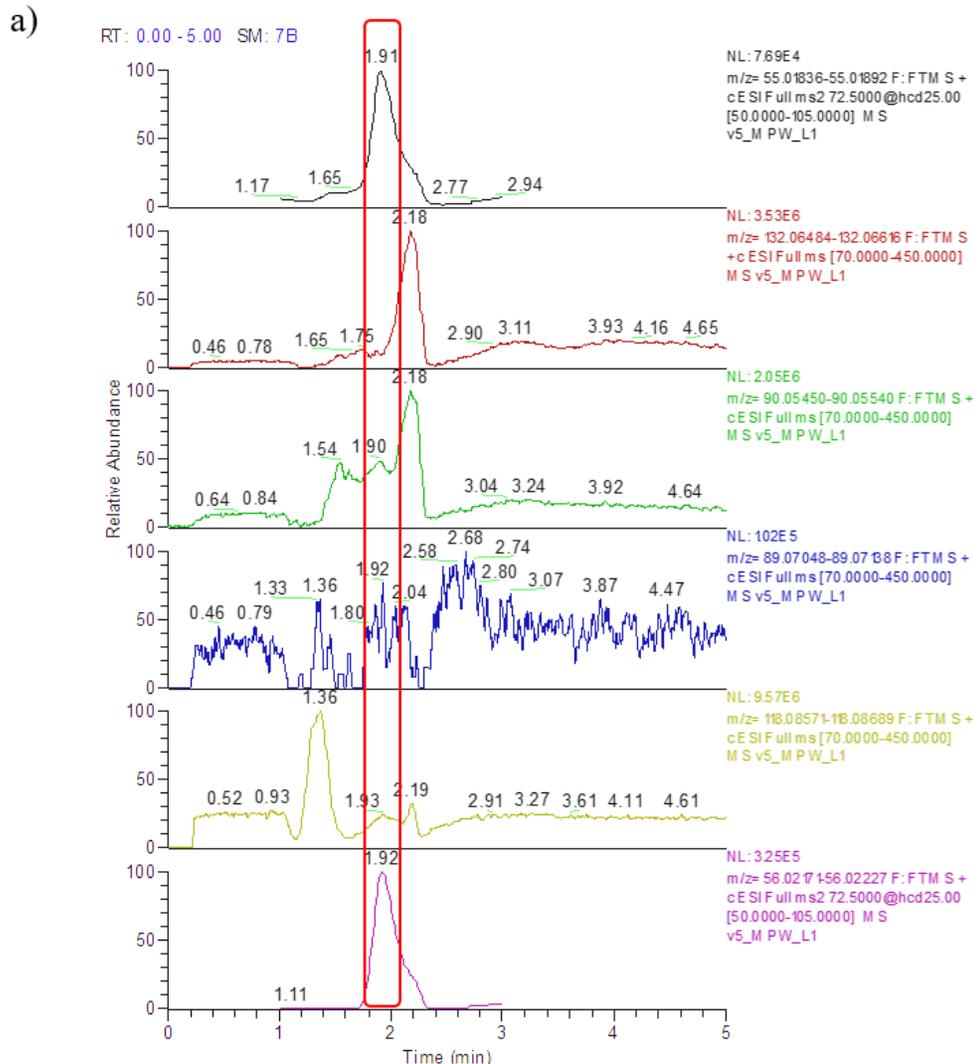
**Figura A22:** Monitoreo de reacción paralela (PRM) en una muestra de base acuosa (AQ) enriquecida con 400 µg/kg para AA, AA-d<sub>3</sub> y <sup>13</sup>C-AA (señal negra, roja y verde, respectivamente) y una muestra de base orgánica (OP) a 5 µg/kg para la OTA (azul y amarillo) utilizando diferentes modos de inyección automatizados. Como solución IS se utilizó una solución acuosa acidificada de triphenylphosphate (TPP) en ácido fórmico al 0,1%. (a) Inyección sándwich 1: primero se toma la alícuota de AQ, luego el IS seguido de la de OP y luego se realiza la inyección. (b) Inyección sándwich 2: primero se toma la alícuota de OP, luego la de IS seguido del AQ y luego se realiza la inyección (orden inverso de la 1). (c) Inyección *Split* (Independiente): Primero se toma la alícuota de AQ, luego la de IS y luego se realiza la primera inyección, en este punto inicia la adquisición. Luego, se toma la alícuota de OP y sólo después de 60 s desde el inicio se realiza la segunda inyección mientras se adquiere.



**Figura A23:** Medidas repetidas RM-ANOVA para probar la recuperación del método en todas las concentraciones para los analitos en el alcance. Para este modelo ( $Y_i = \mu + \alpha_k + \beta_i + (\alpha\beta)_{ik} + \epsilon_i$ ) sea  $Y_i$  la  $i$ -ésima recuperación para cada analito en cada nivel,  $\alpha$  la influencia del nivel de concentración en cada compuesto (factor “dentro” -factor de medidas repetidas),  $\beta_i$  la recuperación global por nivel y  $(\alpha\beta)_{ik}$  un estimado de la relación de la recuperación de un determinado compuesto con un nivel determinado y finalmente,  $\epsilon_i$  el error experimental. (a) Gráfico descriptivo de recuperación por nivel. Es difícil usar etiquetas para describir tantos compuestos, pero se puede ver que el R0 (fortificado a 2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) es notablemente más bajo que los otros niveles. (b) Análisis de datos exploratorios para recuperación global por nivel, las barras de error corresponden al error estándar entre y dentro de los niveles, aunque no entregan información importante ya que está combinada. (c) El diagrama de barras a través de los compuestos muestra ambos errores estándar, pero el error entre compuestos (rojo) es generalmente mayor y muestra la variación de cada uno a través de los niveles de concentración, que es en realidad lo que se usa para la inferencia en el RM-ANOVA (d) Los supuestos: las recuperaciones tuvieron aproximadamente una distribución normal, se corrigió la esfericidad, el error no tuvo desviaciones de una distribución normal y (e) residuos medios nulos,  $\gamma_i \sim N(0, G)$  y  $\epsilon_i \sim N(0, R_i)$ . (f) Los puntos rojos muestran valores atípicos significativos no considerados para el MR-ANOVA, el diagrama de caja muestra diferencias significativas (\*\*\*,  $p < 0,0001$ ) entre niveles de concentración mediante una evaluación independiente por compuesto.

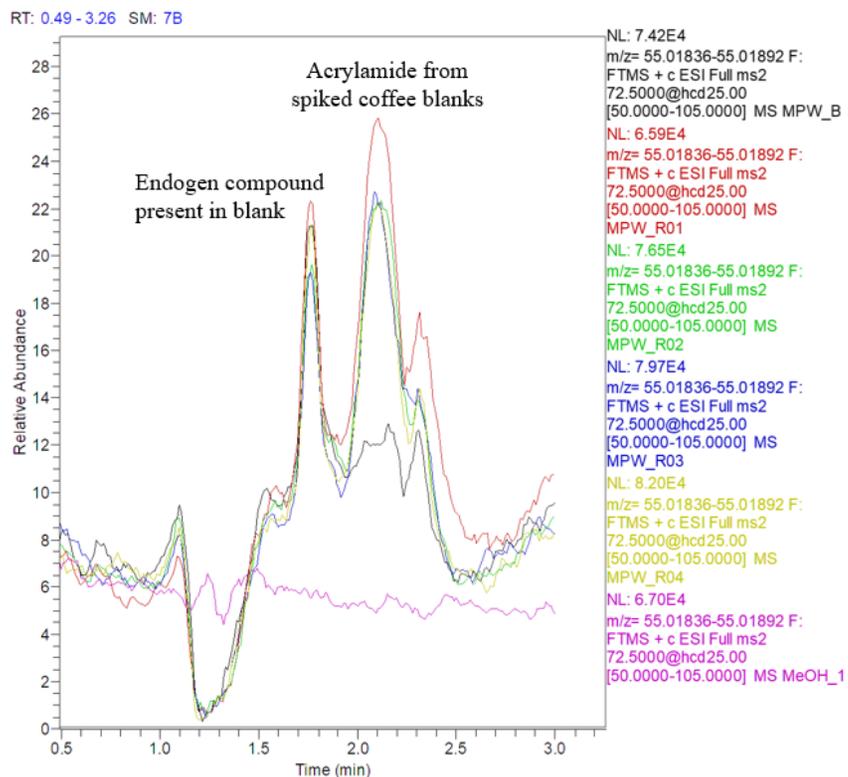


**Figura A24:** Monitoreo de compuestos endógenos en café mostrando la separación de la AA. Señales de colores de arriba a abajo: AA (negro), N-acetyl- $\beta$ -alanine (rojo), lactamide (verde), 3-aminopropionamide (azul), valine (amarillo) y  $^{13}\text{C}$ -AA (violeta). a) Método que utiliza la fase móvil acidificada, el cuadrado rojo muestra una coelución parcial que puede provocar una sobreestimación. b) Elución inicial solo con agua durante los primeros 2 min que aumenta la retención de la AA y asegura la separación de los interferentes; el cuadro rojo muestra el desplazamiento de los picos del estándar de la AA nativa y marcada; esta última sólo se incluye aquí como guía para confirmar que efectivamente el tiempo de retención cambio a 2,13 min.

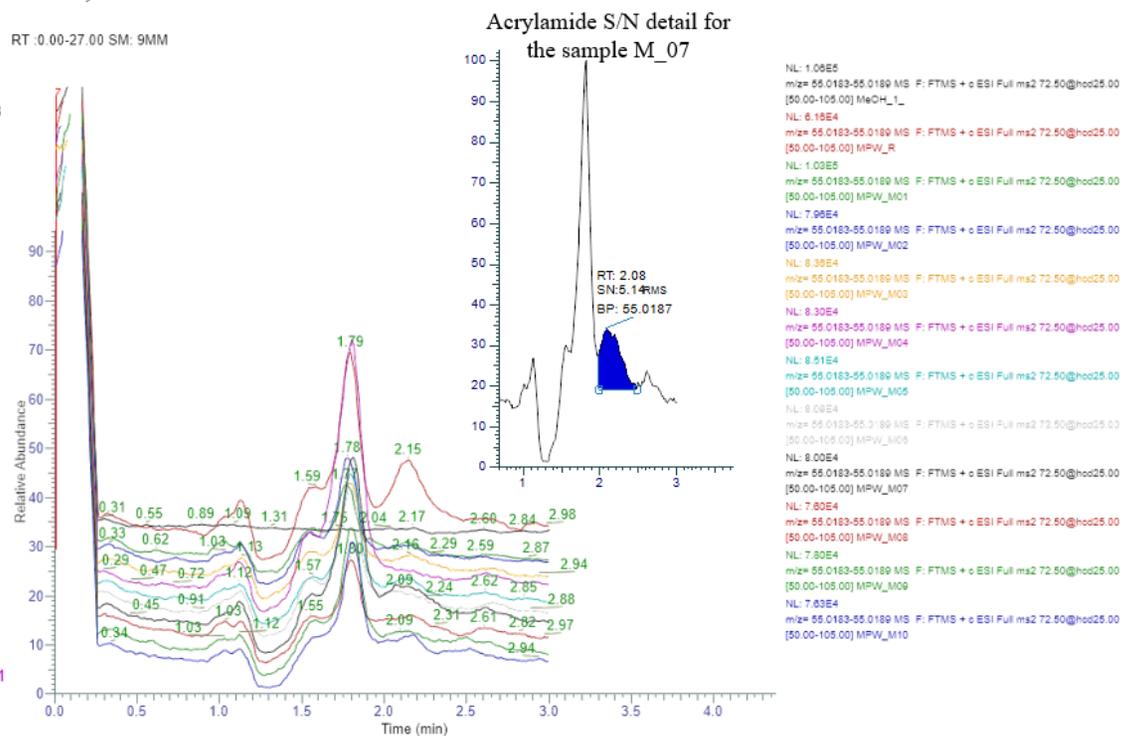


**Figura A25:** Separación de interferencias potenciales de la AA en diferentes muestras de café tostado. a) Experimentos de recuperación de blancos fortificados a 400 µg/kg (n=4) que muestran claramente la separación de la AA de un pico endógeno presente en el blanco (negro) y ausente en una inyección de solvente (MeOH) usada para probar que no se deriva del sistema cromatográfico (violeta), b) EIC de muestras de diferente origen (Argentina, Colombia, Italia, Suecia y España) con un interferente común que está separado de la AA a los 2,15 min en el recuperado (rojo), el recuadro con un detalle de la muestra M\_07 indica un pequeño pico que solo alcanza una S/N ~ 5, por lo que el hallazgo se reporta por debajo del nivel calibrado más bajo.

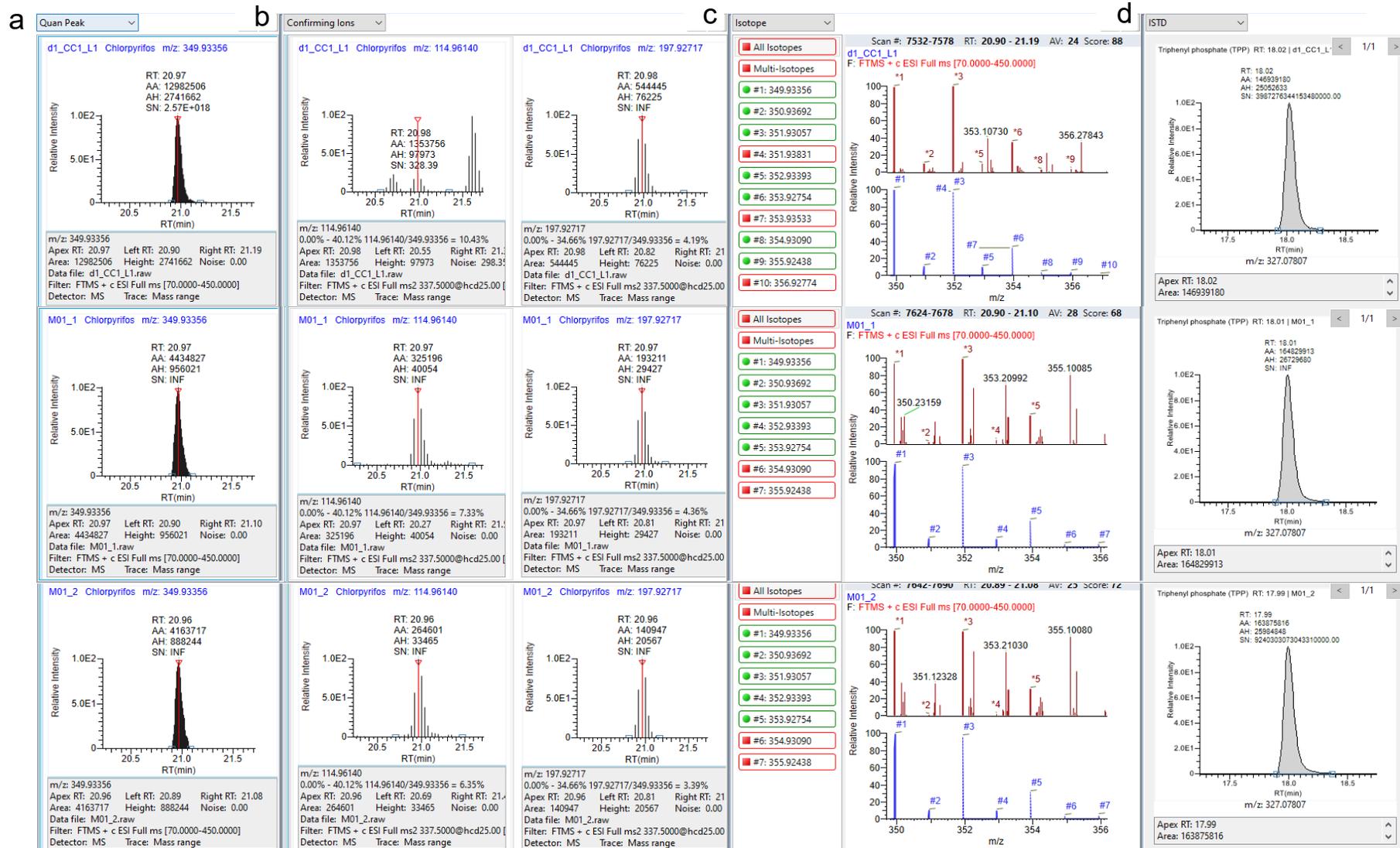
a)



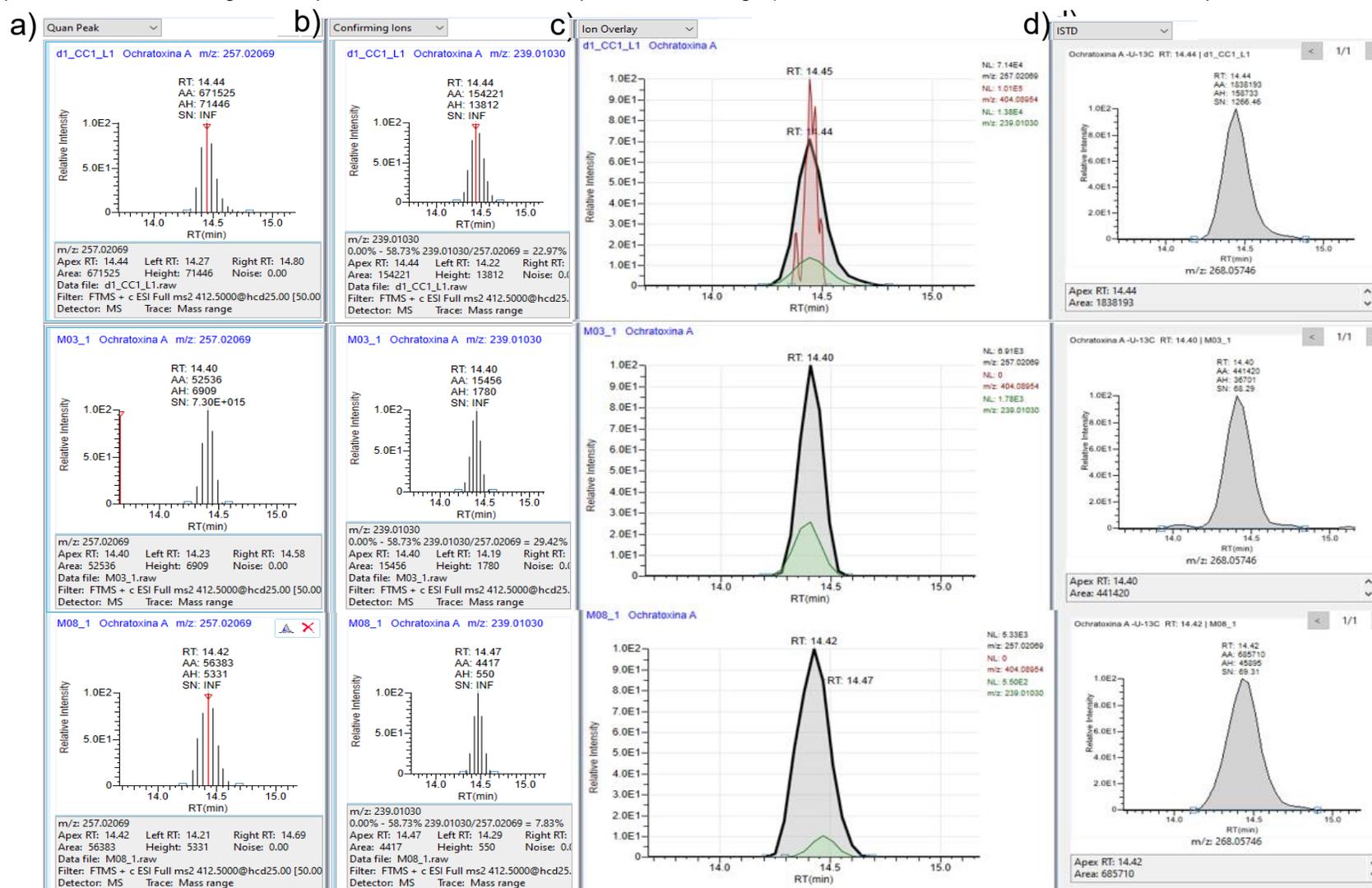
b)



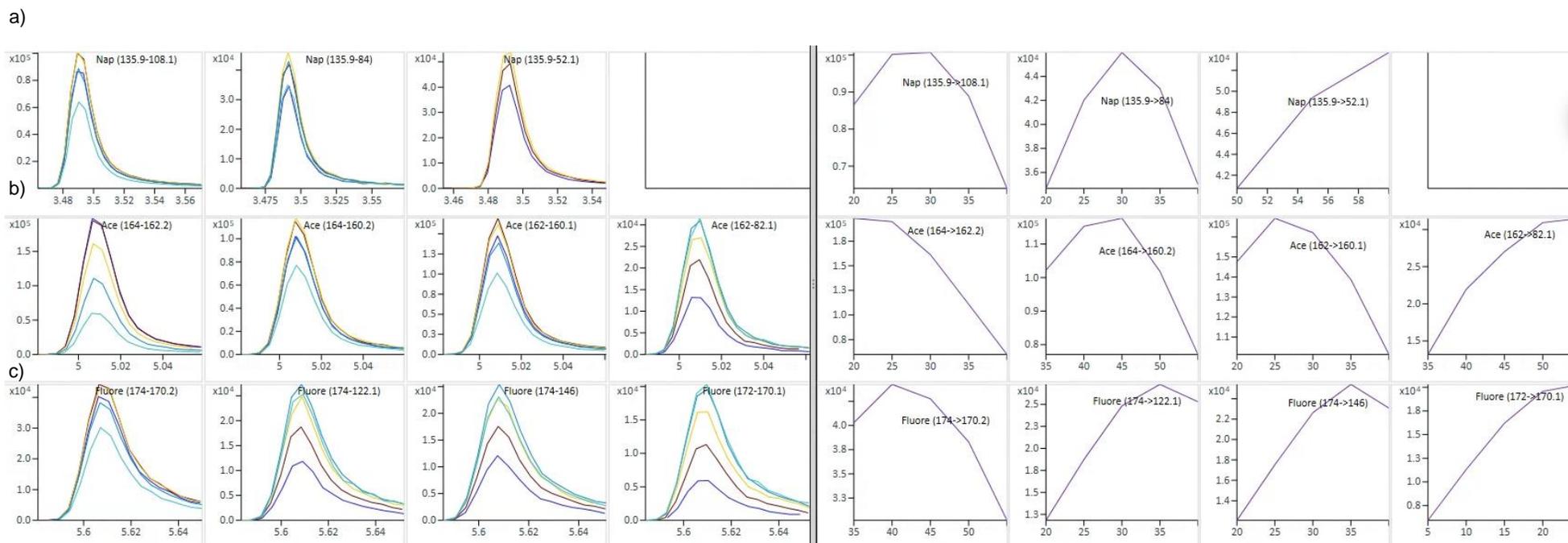
**Figura A26:** Resumen de resultados para una muestra de café de Argentina (M01) torrefacto, robusta/arábica. De arriba a abajo: nivel de calibración en matriz (10 ng/mL), muestra y réplica. a) Cuantificación mediante *Full Scan* (FTMS) que muestra al chlorpyrifos < 5 µg/kg, error de masa (-3,1 y -2,5 ppm). b) Iones producto ( $m/z$ : 114,96140 y 197,92717) confirmados que muestran un error de masa < 5 ppm y proporciones de iones cerca del nivel y entre el 30 % de tolerancia, c) Patrón isotópico (rojo) vs. calculado (azul), isótopos con error de masa < 5 ppm (verde) y como criterio de identificación adicional, d) TPP, estándar interno.



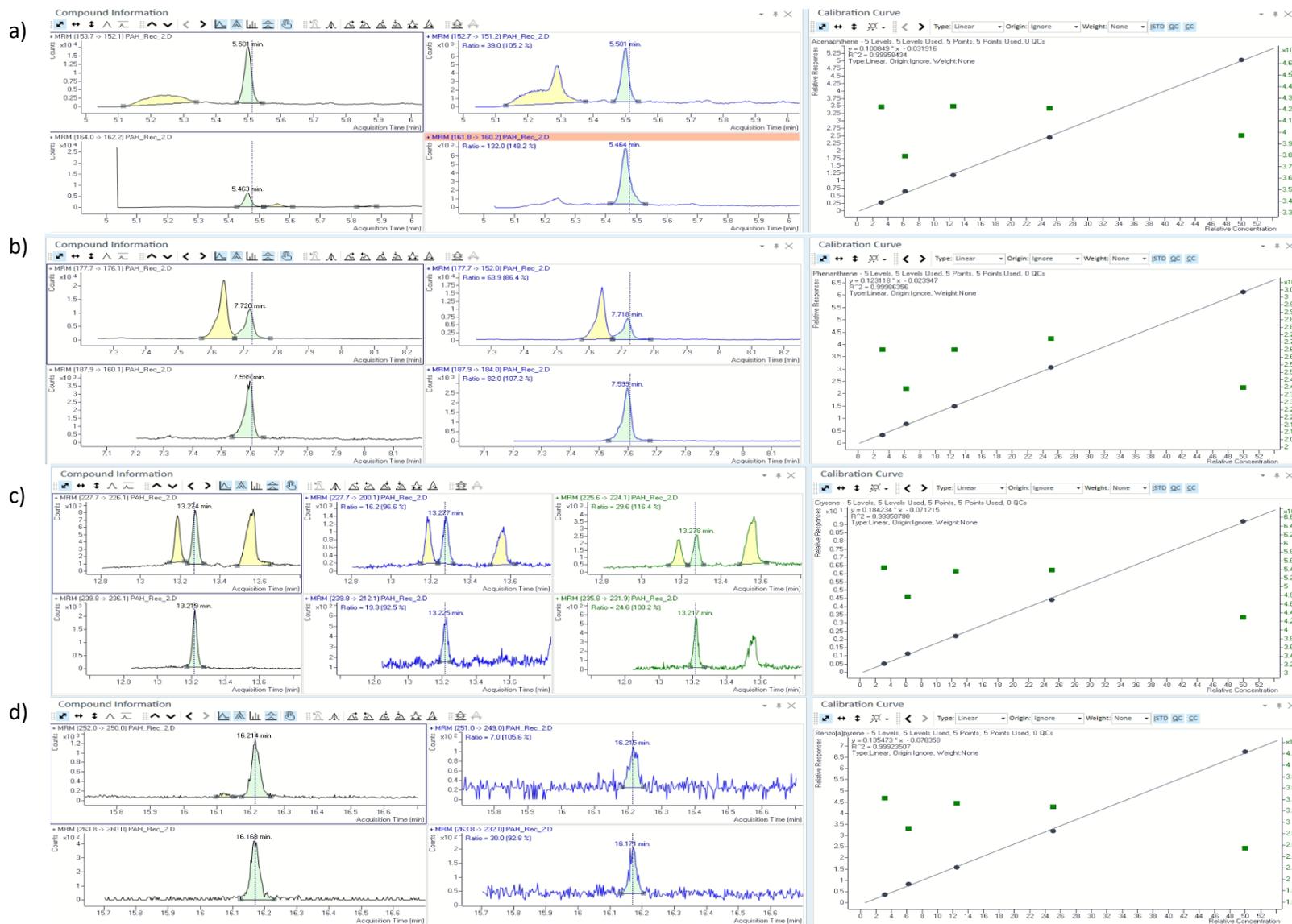
**Figura A27:** Resumen de resultados de hallazgos de OTA en muestras de café de España. De arriba a abajo: nivel de calibración en matriz (5 ng/mL), muestra M03, 100 % torrefacto, arábica y M08, 50 % mezcla de torrefacto, robusta/arábica. a) Pico de cuantificación en PRM ( $m/z$ : 257,02069) que muestra OTA < 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en ambas muestras con error de masa bajo (-0,83 y -0,35 ppm, respectivamente), b) Ion calificador ( $m/z$ : 239,01030) con una proporción de iones más cercana al nivel para M03 que para M08, c) Superposición de iones donde el ion precursor (rojo) solo se puede ver en los EIC del nivel, el ion calificador (verde) muestra una posición coaxial, cromatograma sin procesamiento artificial de los puntos o *smoothing*, d)  $^{13}\text{C}$ -U-OTA, estándar interno marcado con isótopos.



**Figura A28:** Ejemplos de la optimización de la energía de colisión en GC-MS/MS. Picos superpuestos de cromatogramas iones de extraídos a diferentes energías de colisión a la izquierda, y gráficos de abundancia de las transiciones para cada condición (CE). a) Naphthalene-d<sub>8</sub> (Nap), b) Acenaphthalene-d<sub>10</sub> (Ace) y c) Fluorene-d<sub>10</sub> (Fluore).



**Figura A29:** Cromatogramas mostrando el pico del analito sobre el respectivo ILIS (HAP-dx, x=número total de hidrógenos en la fórmula molecular de cada HAP) en los ensayos preliminares de recuperación de 4 HAPs a 12,5 µg/kg con el método dSPME-GC empleando GCB en modo dMRM (GC-MS/MS). Recuadros de izquierda a derecha: ion de cuantificación, ion de calificación, curva de calibración del analito (●) con relación al área del ILIS (■). a) Acenaphthene, b) Phenanthrene, c) Crysene y d) Benzo(a)pyrene.



**Figura A30:** Comparación de la eficiencia de desorción sobre GCB de 12 HAPs extraídos con el método dSPME-GC en términos absolutos (área) y relativos (% de diferencia) respecto al uso de acetona, empleada como referencia.

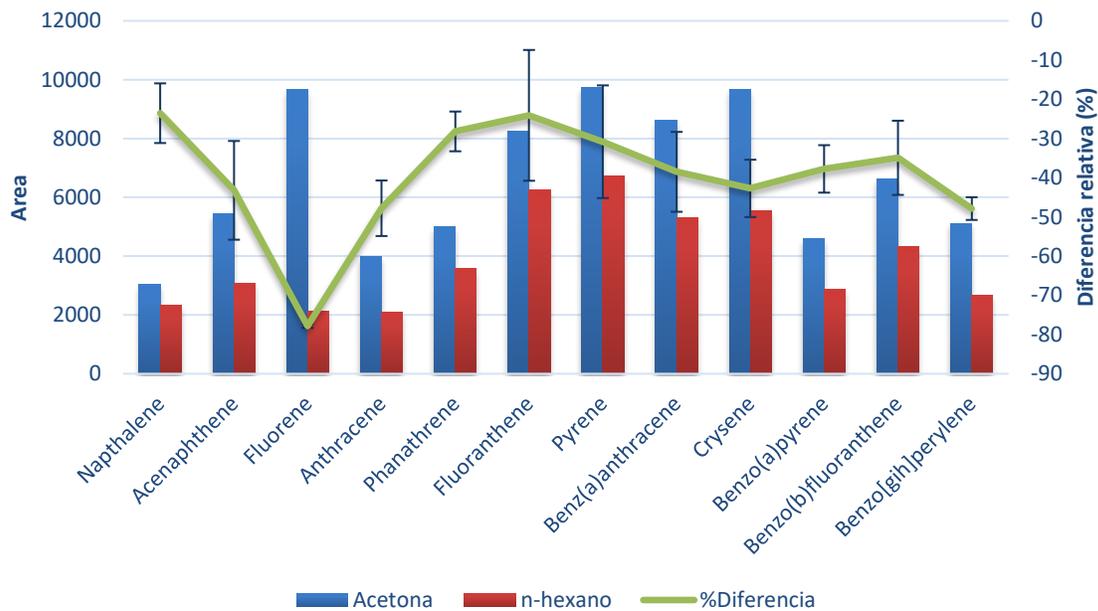
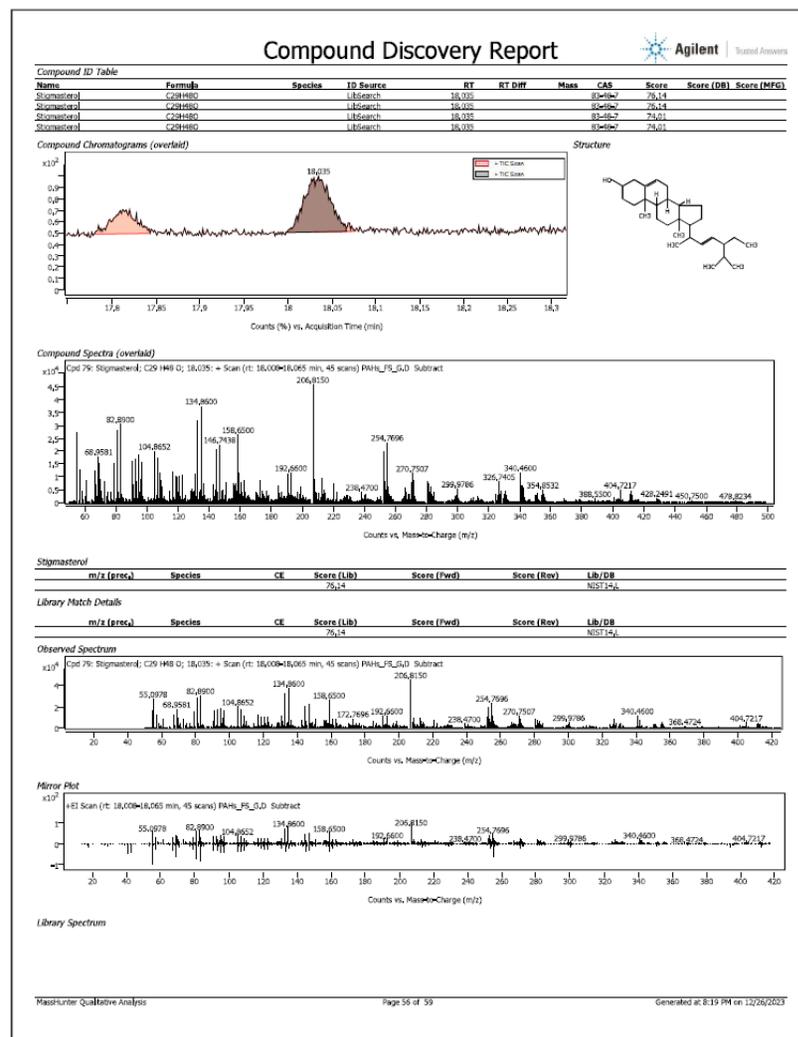
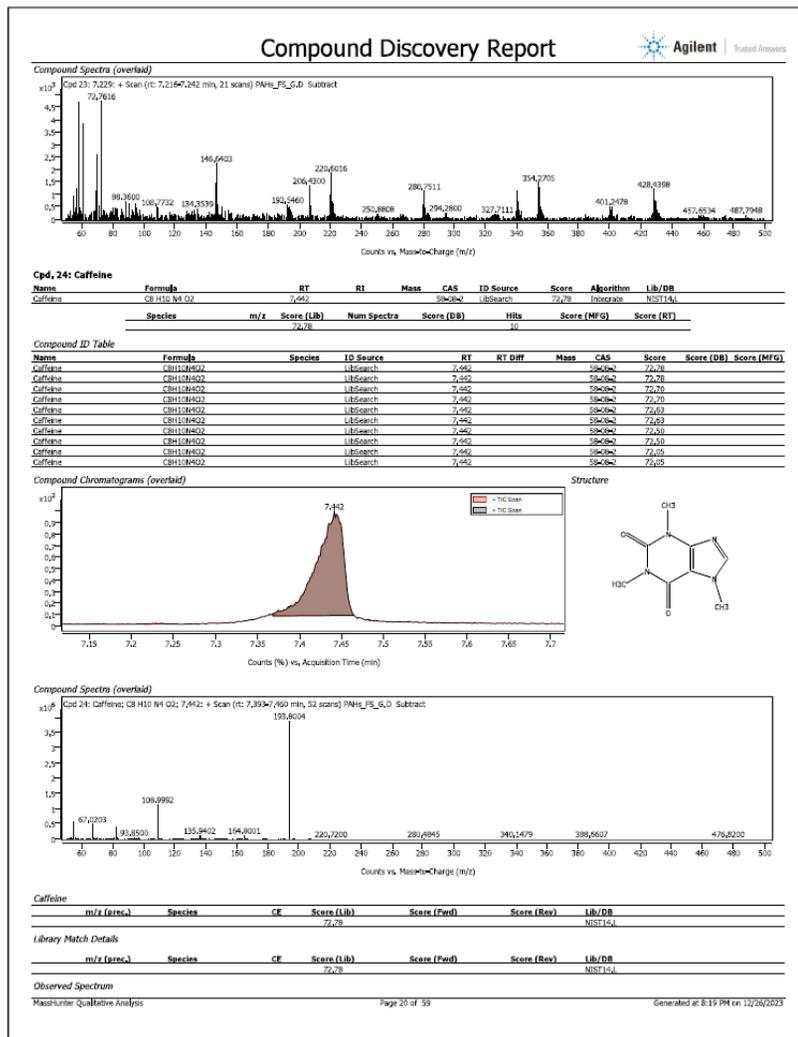
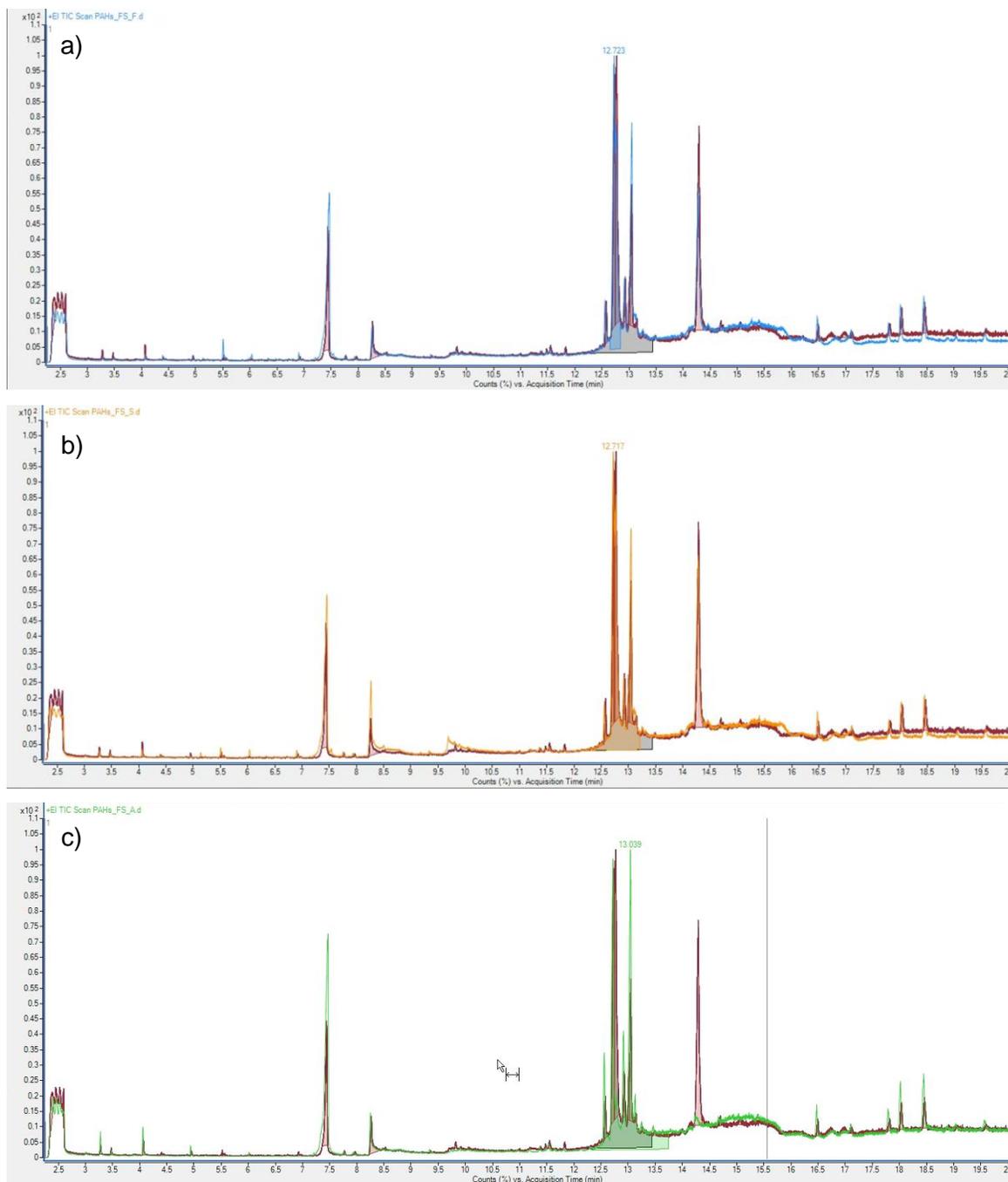


Figura A31: Ejemplos match en FS (Espectro completo), extracto del reporte automatizado "Compound Discovery Report" para los hits Cafeine y Stigmasterol.

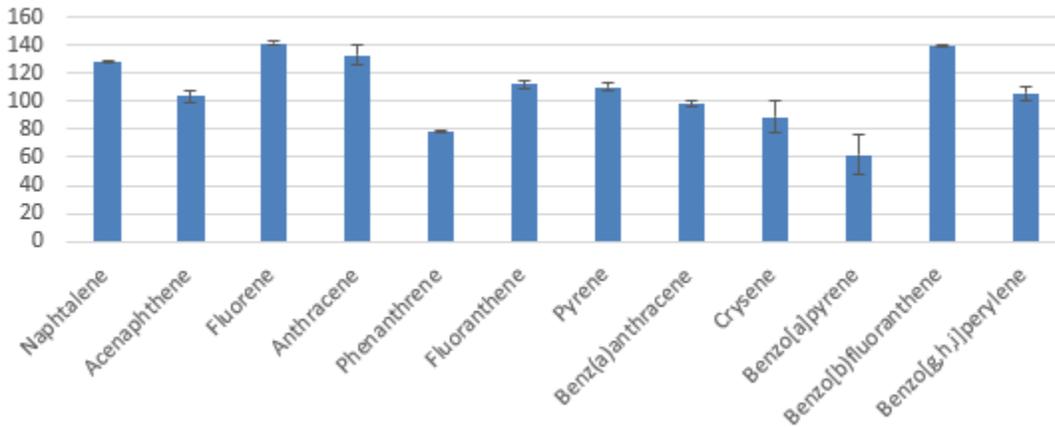




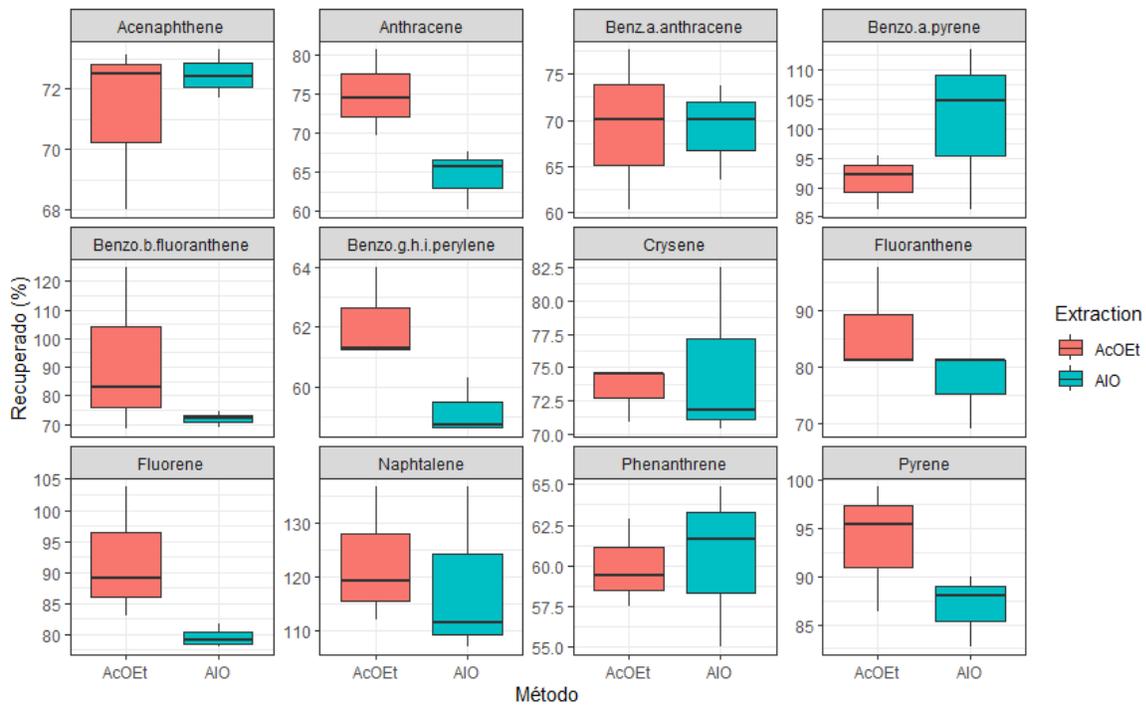
**Figura A32:** Comparativo del TIC en modo FS de extractos de café por el método dSPME-GC empleando adsorbentes alternativos al GCB (rojo, usado como referencia). a) Florisil (azul), b) Sílica (naranja) y c) Alúmina (verde).



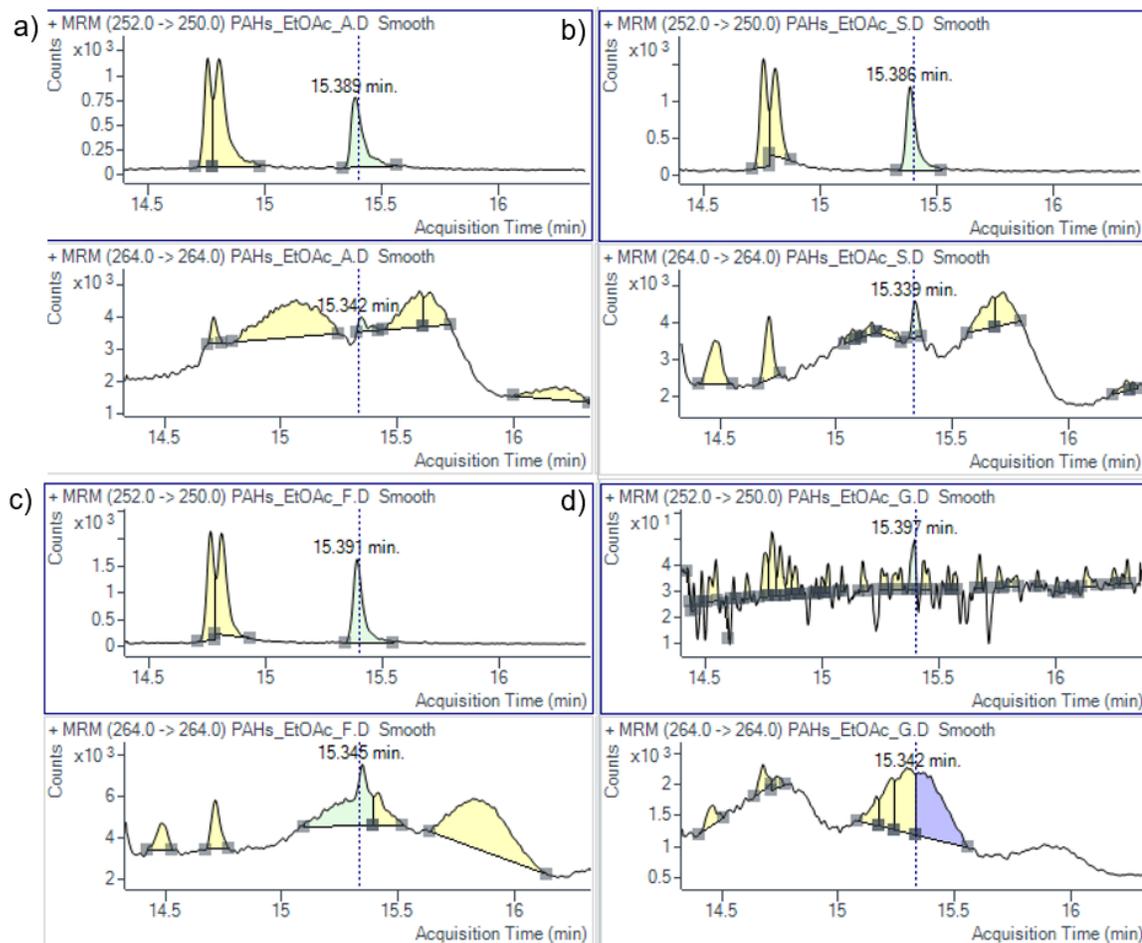
**Figura A33:** Ensayos de recuperación de 12 HAPs extraídos con el método dSPME-GC empleando alúmina a 100 µg/kg.



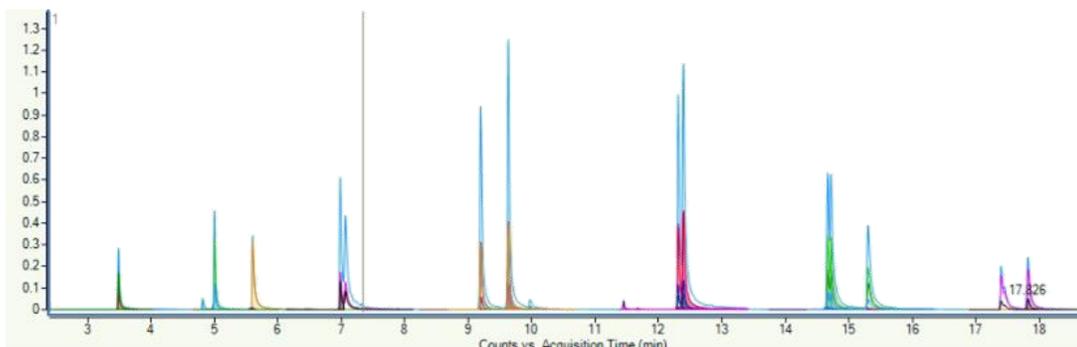
**Figura A34:** Ensayos de recuperación de 12 HAPs extraídos con el método dSPME-GC empleando Alúmina para evaluar la extracción tipo AIO vs. simplificada sin agua (AcOEt).



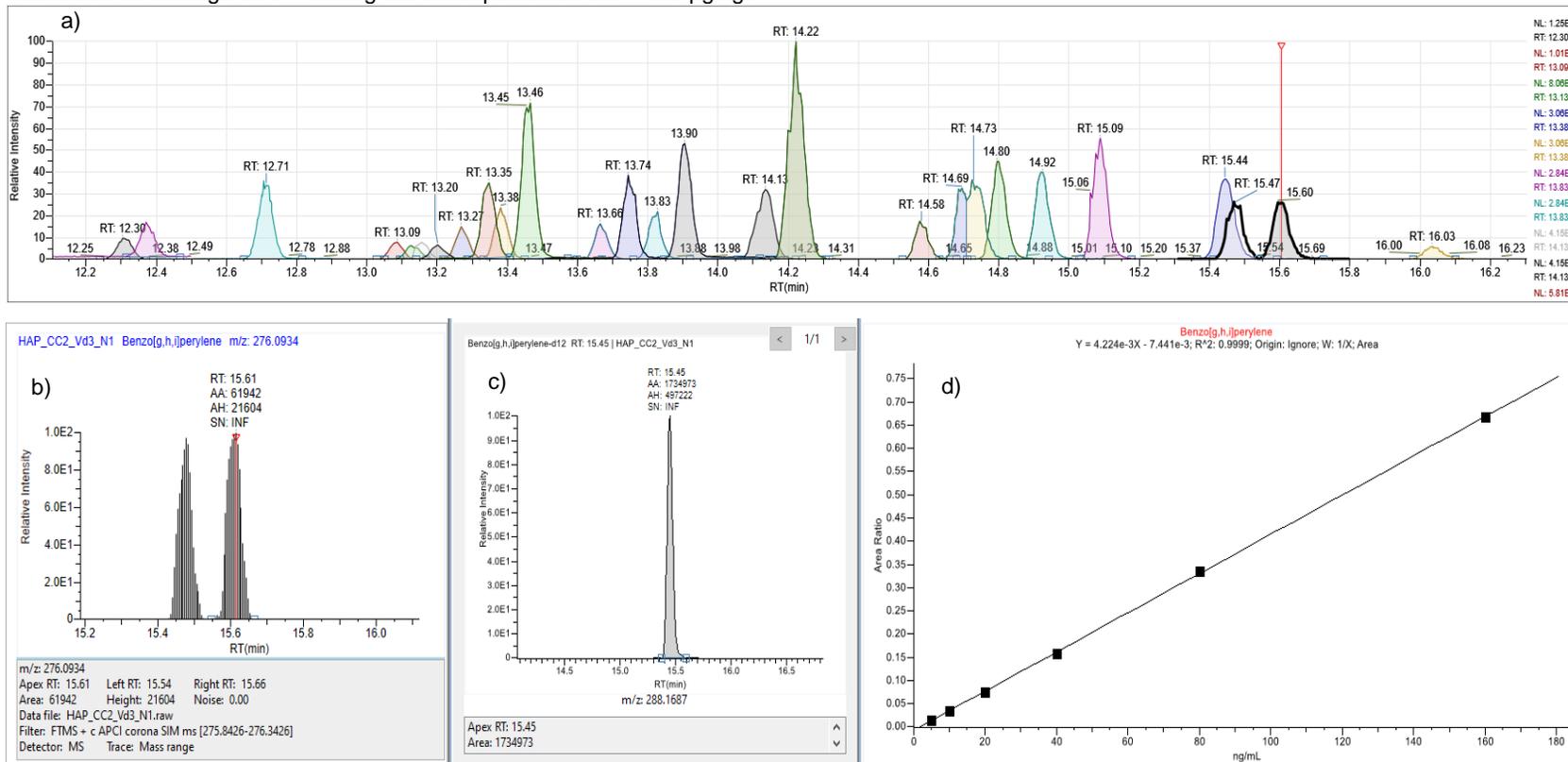
**Figura A35:** Ejemplo de interferencia que cubre los picos de la transición del benz[g,h,i]perylene-d<sub>12</sub> usado como estándar interno (celda inferior) en el método dSPME-GC. a) Alúmina, b) Sílica, c) Florisil y d) GCB. Particularmente, no se observan señales del analito ni el ILIS en GCB después de varias inyecciones.



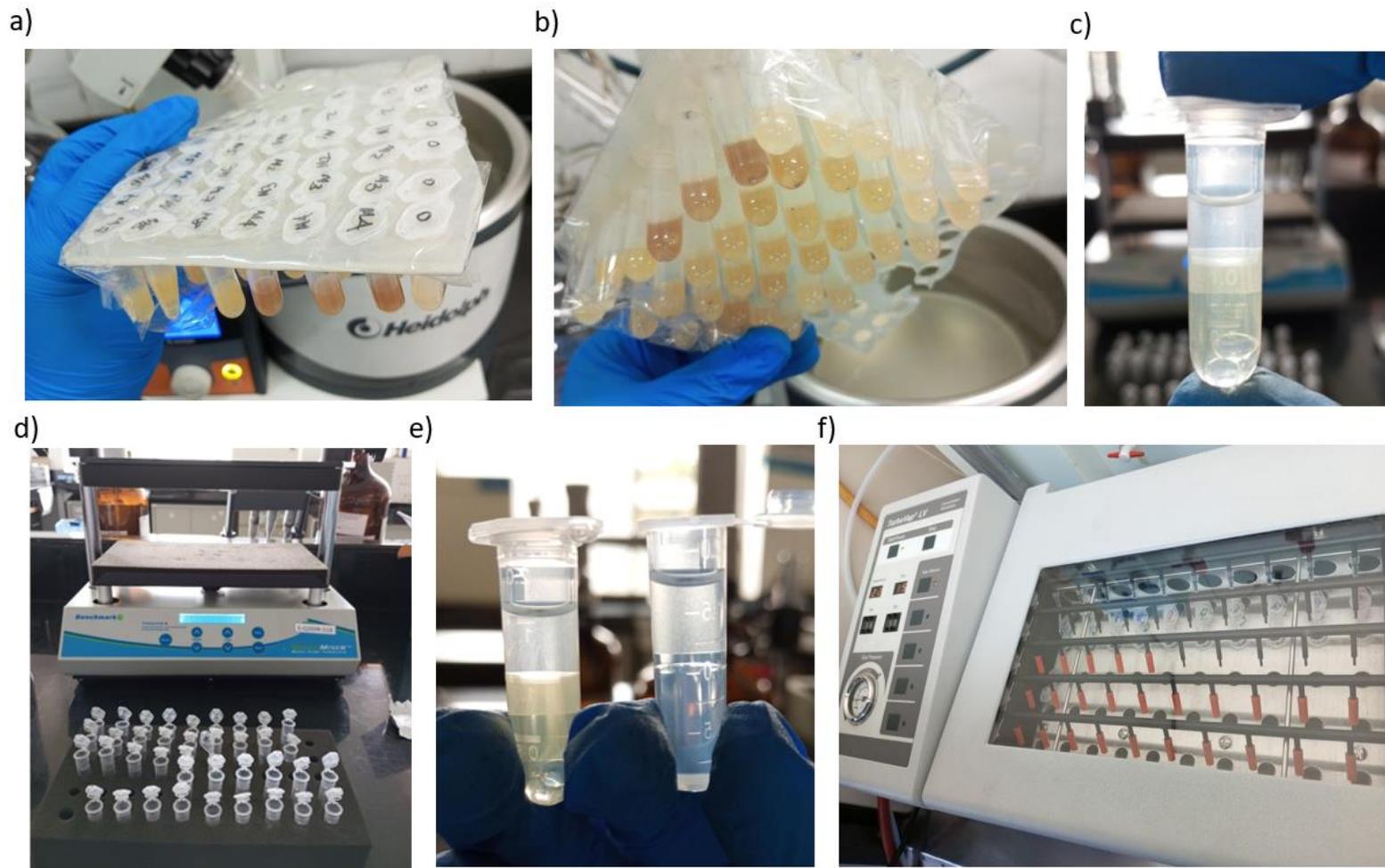
**Figura A36:** Superposición de transiciones de HAPs a las concentraciones de una curva de calibración por GC-MS/MS. La baja sensibilidad al Benzo[g,h,i]perylene a 17.826 min dificulta su determinación.



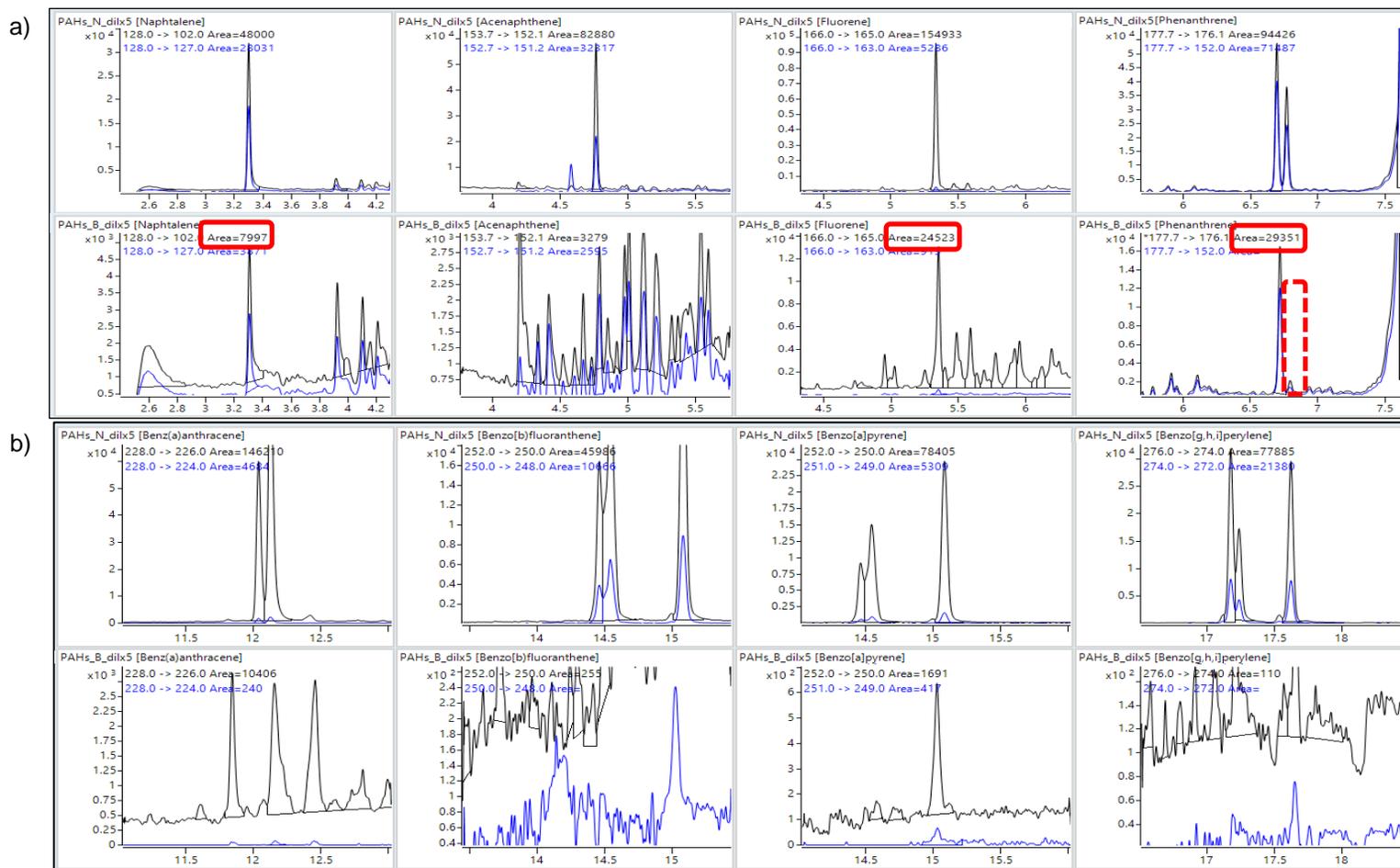
**Figura A37:** Análisis de PAHs por LC-APCI-HRMS. a) Separación cromatográfica de un nivel de calibración en matriz de café que contiene 16 PAHs y 13 PAH-dx (ILIS). b) Ejemplo del pico del benz[*g,h,i*]perylene (señalado, barra roja) que comparte la misma masa exacta del indeno[1,2,3-*cd*]pyrene (*m/z* : 276.0934). c) Estándar interno correspondiente benz[*g,h,i*]perylene-*d*<sub>12</sub>, ausencia de interferencias a Resolución: 70000 FWHM y MEW: 5ppm. d) Curva de calibración en el rango de 5 – 180 ng/mL correspondiente a 5 – 180 µg/kg.



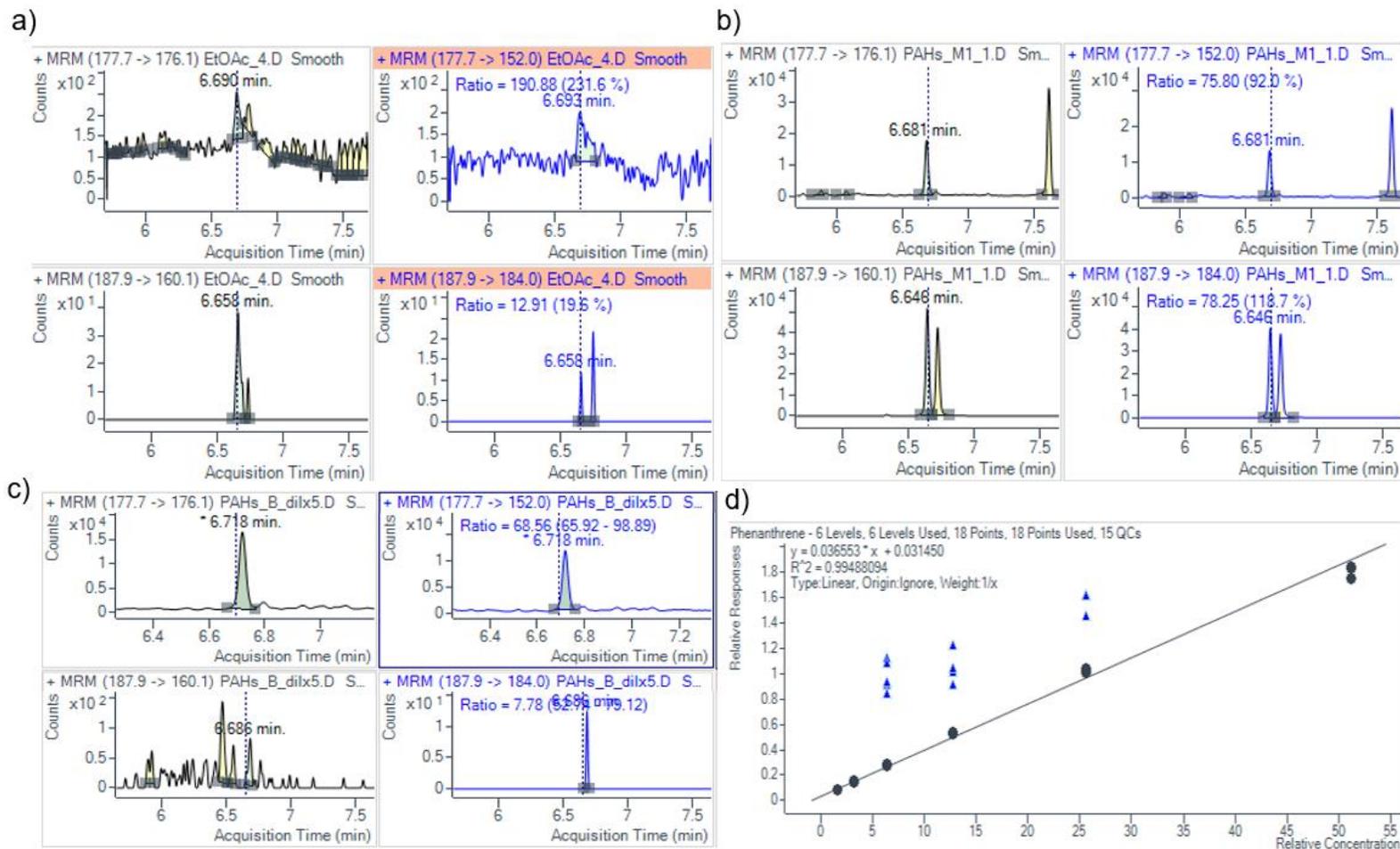
**Figura A38:** Registro fotográfico transesterificación. a) Lote con KOH/EtOH, agitación por 12 h a 74°C, b) evidencia de burbujas por la formación de jabón, c) partición con n-hexano asistida con perlas y vortex, d) limpieza del extracto orgánico con solución acuosa, e) comparación extracto original, tubo izquierdo abajo vs. extracto limpio, f) evaporación en serie con concentrador de nitrógeno del extracto limpio que deja un residuo blanco a sequedad.



**Figura A39:** Comparación de las transiciones de HAPs en matriz de café fortificada post-extracción (arriba, nivel) vs. extracto sin fortificar (abajo, "blanco"). a) Grupo I de compuestos de elución temprana (HAPs ligeros) que exhiben picos y ruido de matriz excesivo y que resulta en la integración de áreas significativas en el recuadro que impacta la selectividad del método. b) Grupo III de compuestos (HAPs pesados) con ruido de fondo, pero sin interferencias significativas.



**Figura A40:** Comparación de transiciones del phenanthrene nativo (arriba) e ILIS (abajo), curva de calibración y ensayos de recuperación. a) Ejemplo de solvente después de nivel más alto que exhibe *carryover* considerado normal (<<0,1%). b) Muestra M1 en que se observa arriba phenanthrene y abajo dos picos propios de la pareja de ILIS, en apariencia se puede tratar de un positivo que debe ser cuantificado y reportado pues cumple la relación de iones (92,0%), c) presencia del mismo pico en extracto del material considerado como “blanco”, d) curva de calibración (●) y ensayos de recuperación (▲) afectados por cantidades preexistentes.



**Figura A41:** TIC de la solución de prueba *system suitability* posterior al cambio del inserto de vidrio después de una secuencia ininterrumpida para la validación con más de 75 inyecciones de extractos obtenidos con el método de transesterificación. Compuestos: 1) HCB, 2)  $\beta$ -HCH, 3)  $\gamma$ -HCH, 4) Chlorpyrifos, 5) 4'-DDD y 6) 4'-DDT.



**Tabla A1** Detalles de la configuración de adquisición de datos en el analizador Orbitrap según el tipo de experimento.

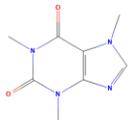
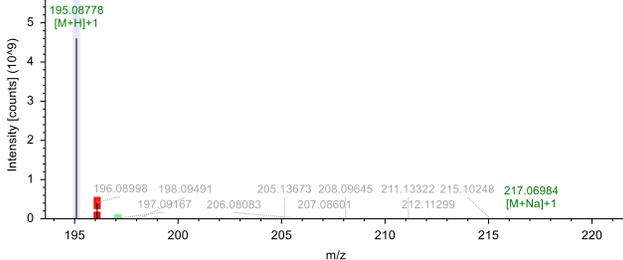
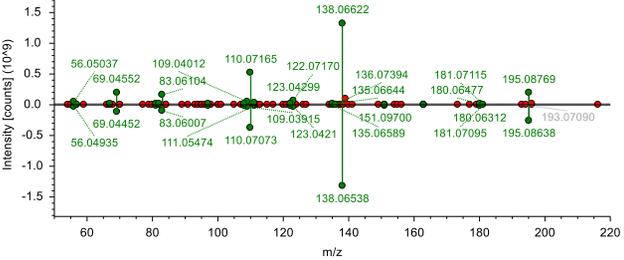
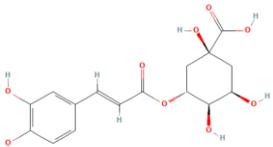
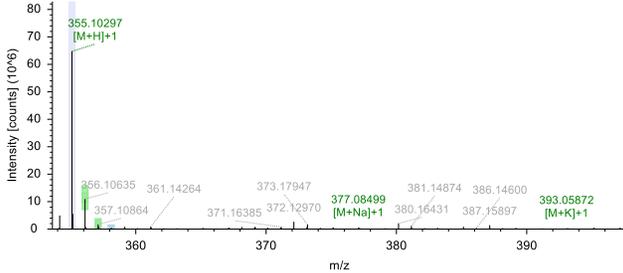
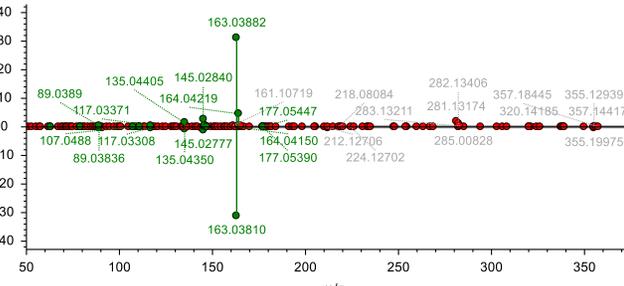
Método	Descripción	Detalles
1	Intercambio de polaridad - Full Scan (FS)	Poder de resolución (RP) de 70000 FWHM a 200 m/z, rango de masas de 120 a 1000 Da, Control Automático de Ganancia (AGC) de $3 \times 10^6$ cargas, Tiempo Máximo de Inyección (maxIT) automático, microscans: 1 y tipo de datos de espectro centroide. El voltaje de ESI fue de 3,5 kV en modo positivo y de 2,5 kV en modo negativo. En el caso del experimento de torrefacto se implementó una variación. El modo de adquisición fue monitoreo de ion (SIM) reduciendo el rango de masas a 1 Da alrededor de masas de interés seleccionadas en el tiempo de retención de OTA y el producto acilglucósido.
2	Full Scan – Data dependent MS2 (FS-ddMS2)	Las condiciones para el FS fueron las mismas que las del experimento del Método 1, pero solo se ejecutaron en modo positivo y se seleccionó el tipo de datos del espectro en perfil. En el Análisis Data dependent (DDA), el <i>master scan</i> (FS o MS1) es seguido por scans MS2 dependientes de los datos que se activan con el <i>master scan</i> (modo Discovery en el software Tune™). Las condiciones fueron RP de 17500 FWHM, ventana de aislamiento: 3,0 m/z, energía de colisión (CE) de 30 eV, estado de carga predeterminado: 1, AGC: $1 \times 10^5$ cargas, maxIT automático, <i>loop count</i> : 1, AGC mínimo: $1 \times 10^3$ cargas, umbral de intensidad configurado automáticamente, <i>apex trigger</i> : 3 a 9 s, exclusión dinámica en automático, exclusión de carga $\geq 2$ , exclusión de isótopos activada y tipo de datos en centroide.
3	Monitoreo de reacción paralela (PRM)	La configuración de RP fue 17500 FWHM, ancho de aislamiento de MS2: 3,0 m/z, CE: 25 eV, estado de carga predeterminado: 1, AGC: $1 \times 10^6$ cargas, maxIT automático y tipo de datos en centroide. El voltaje de ESI fue de 3,5 kV en modo positivo.
4	Full Scan – wide Parallel Reaction Monitoring o Monitoreo "amplio" de reacción paralela (FS-wPRM)	<p>En el modo de adquisición FS-wPRM, el gradiente anterior se modificó para lograr mejor separación del conjunto de analitos. Se comenzó con 100% A. Después de 2 min el porcentaje de B se incrementó al 40%, seguido de otro incremento al 70% a los 16 min, y finalmente alcanzó el 100% a los 23 min. Esta última composición se mantuvo por 2 minutos y luego se redujo abruptamente a 0 % en 0,1 minutos; finalmente, se mantuvo durante 2 min para permitir el equilibrio de la columna para la siguiente ejecución; el tiempo total de ejecución aumentó a 27 minutos en esta versión extendida. El automuestreador WPS-3000RS se programó con un script con instrucciones (UDP) para tomar 2 <math>\mu</math>L de una posición fija que contenía una solución de TPP y ácido fórmico al 0,1 % como estándar interno (I.S.) para los compuestos sin estándar marcado disponible, seguido de un espacio de 5 <math>\mu</math>L de aire y luego 10 <math>\mu</math>L de muestra tipo acuosa para iniciar la adquisición. Luego, la válvula cambia a la posición de inyección, se coloca la válvula de la jeringa y la aguja en posición de parqueo y se esperan 30 s. Luego se toman 10 <math>\mu</math>L de la muestra tipo orgánica y se inyecta mientras el instrumento está funcionando. Finalmente, el muestreador automático cambia la válvula a posición de residuos para lavar y drenar 25 <math>\mu</math>L de solución de lavado de jeringa (MeOH 50%) para preparar la siguiente muestra. En resumen, este método permite la inyección en serie automática de muestras basadas en IS, AQ y OP para su adquisición en el mismo análisis.</p> <p>Las condiciones para el FS fueron: RP 35000 FWHM, rango de masa de 70 a 450 Da, AGC: <math>3 \times 10^6</math> cargas, maxIT automático, microscans: 1 y tipo de datos de espectro centroide seleccionado. El voltaje ESI fue de 3,5 kV en modo positivo. Las condiciones para el PRM fueron las siguientes: RP 35000 FWHM, ventana de aislamiento: 25,0 m/z, CE: 25 eV, estado de carga predeterminado: 1, AGC: <math>1 \times 10^6</math> cargas, maxIT automático y tipo de datos centroide. Se seleccionaron ventanas amplias en la lista de inclusión en este modo (wPRM) para imitar un modo de adquisición DIA con fragmentación en la celda de disociación de colisión de alta energía (HCD) pero en segmentos de m/z seleccionados que se desplazan durante la ejecución.</p>

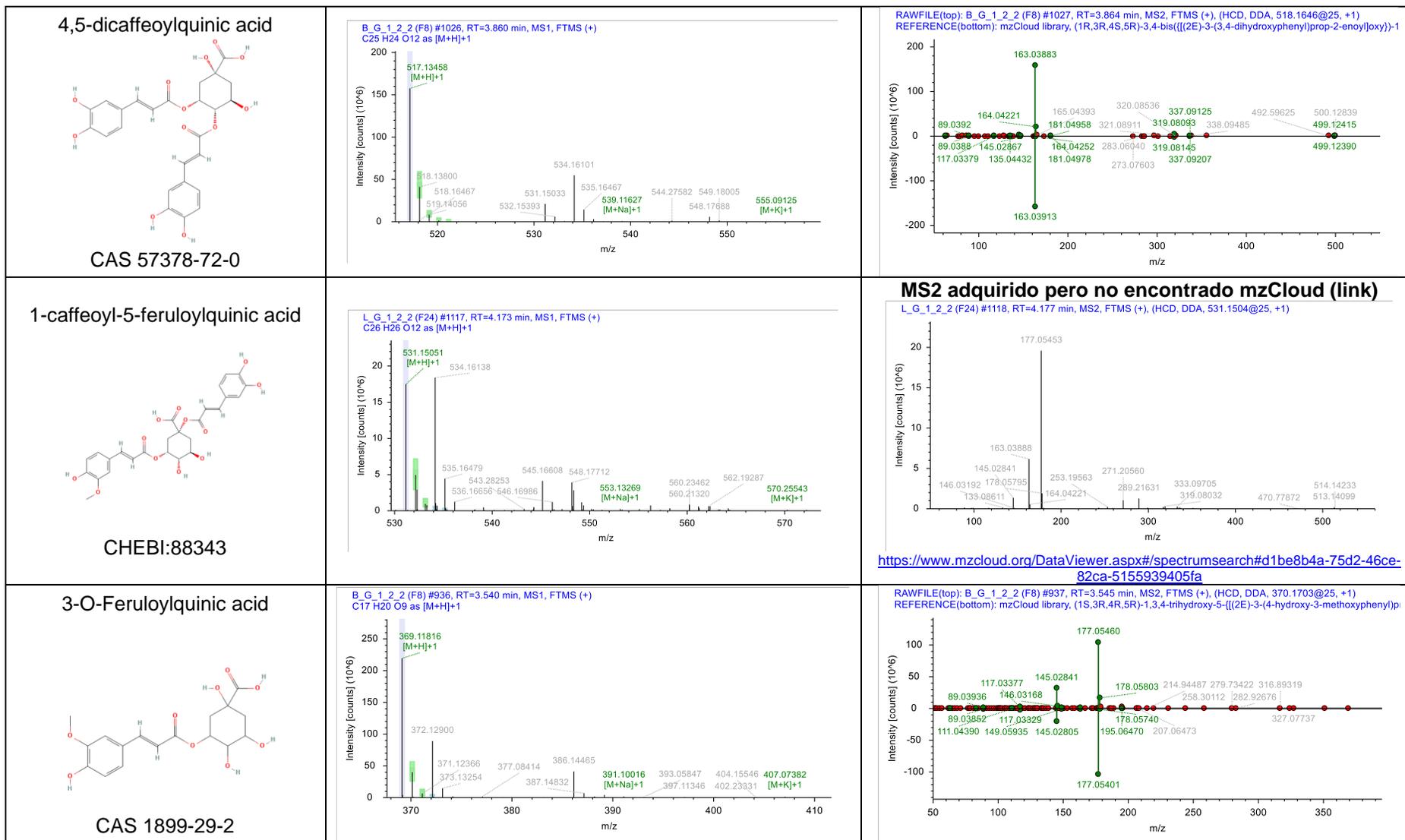


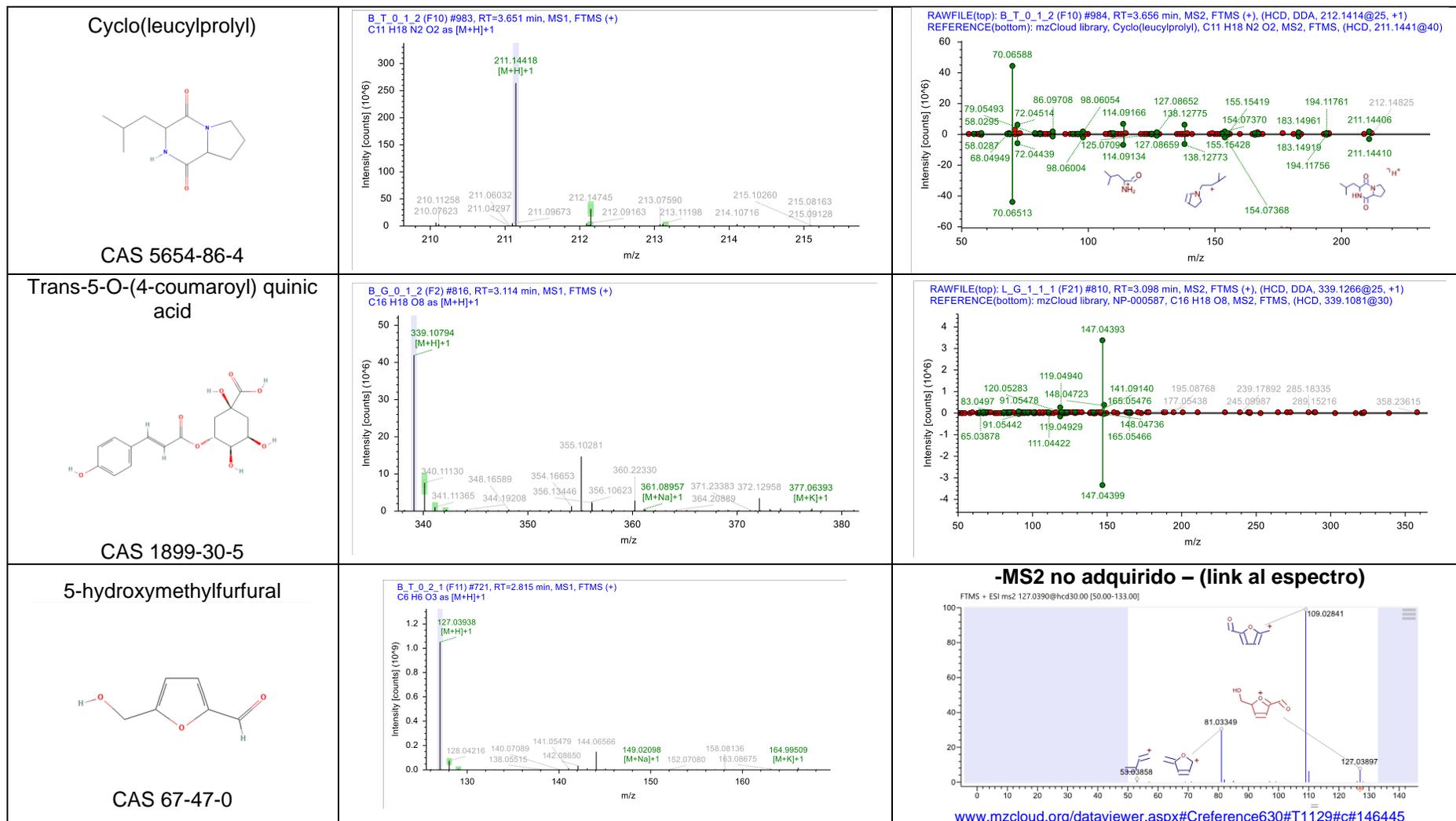
**Tabla A2.** Condiciones experimentales del diseño D-Optimal. Restricciones:a)  $0 \leq \text{ACN} \leq 0,5$ , b)  $0 \leq \text{MeOH} \leq 0,5$ , c)  $0,5 \leq \text{H}_2\text{O} \leq 1$ , d)  $0 \leq \text{ACN} + \text{MeOH} \leq 0,5$ 

Mix	Proporción de componentes en la mezcla		
	ACN	MeOH	H <sub>2</sub> O
1	0	0	1
2	0	0,25	0,75
3	0,5	0	0,5
4	0	0,5	0,5
5	0,25	0,25	0,5
6	0,25	0	0,75
7	0,333	0,083	0,583
8	0,083	0,083	0,833
9	0,083	0,333	0,583
10	0,167	0,167	0,667

**Tabla A3.** Ejemplos de compuestos endógenos. Espectros MS1 que muestran masas codificadas por colores dentro de la tolerancia en un cuadro verde y en cuadros rojos cuando no se cumple el score isotópico como criterio para una anotación de la estructura tentativa (Nivel 3) del ion monoisotópico en el cuadro gris. Los espectros de fragmentación MS2 muestran en rojo cuando no se cumplen los iones producto y coincidencias directas de fragmentos en verde. El reflejo de los puntos es la fragmentación HCD de referencia de la biblioteca para la identificación de sospechosos (Nivel 2) utilizando el modo de adquisición FS-DDA (dd-MS2).

Nombre/Estructura/ID	MS1 (M+H + aductos)	MS2 (HCD, DDA vs. mzCloud library, si está disponible)
<p data-bbox="254 508 359 532">Caffeine</p>  <p data-bbox="226 781 386 805">CAS 58-08-2</p>	<p data-bbox="562 500 877 529">L_G_0_1_2 (F18) #951, RT=3.595 min, MS1, FTMS (+) C8 H10 N4 O2 as [M+H]<sup>+</sup></p> 	<p data-bbox="1264 500 1913 529">RAWFILE(top): L_G_0_1_2 (F18) #952, RT=3.600 min, MS2, FTMS (+), (HCD, DDA, 195.1624@25, +1) REFERENCE(bottom): mzCloud library, 1,3,7-trimethyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purine-2,6-dione, C8 H10 N4 O2, M</p> 
<p data-bbox="205 833 407 857">Chlorogenic acid</p>  <p data-bbox="218 1138 394 1162">CAS 327-97-9</p>	<p data-bbox="562 841 877 870">B_T_0_1_2 (F10) #799, RT=3.048 min, MS1, FTMS (+) C16 H18 O9 as [M+H]<sup>+</sup></p> 	<p data-bbox="1264 828 1944 857">RAWFILE(top): B_T_0_1_2 (F10) #800, RT=3.052 min, MS2, FTMS (+), (HCD, DDA, 356.1716@25, +1) REFERENCE(bottom): mzCloud library, (1r,3R,4s,5S)-4-(((2E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoyl)oxy)-1,3,5-trihydroxybenzoic acid, C16 H18 O9, M</p> 





**Tabla A4.** Resultados de la evaluación de la homogeneidad del material utilizando un tamaño de muestra de 50 mg como parte del desarrollo del método. La tabla ANOVA de una vía incluye la suma de cuadrados (MS) entre unidades (bu, lote) y dentro de la unidad (wu, submuestras) y se relaciona con el diseño anidado de dos niveles utilizado para estimar las contribuciones a la varianza.

Fuente	Expresión	Componente	AA	OTA
Cálculos con los términos de la tabla ANOVA	$S_{bu}^2 = \frac{MS_{bu} - MS_{wu}}{n_0}$	$S_{bu}$	16,14	0,0457
	$u_{bu}^* = \sqrt{\frac{MS_{wu}}{n}} \times \sqrt{\frac{2}{v MS_{wu}}}$	$u_{bu}^*$	7,62	0,0235
	$S_{Meas}^2 = \frac{MS_{wu}}{n}$	$S_{Meas}$	4,72	0,0187
Incertidumbre calculada usando cada método	$u_{bu1}(\%) = \frac{S_{bu}}{Mean_{total}} \times 100$	$u_{bu1}(\%)$	5,21	1,17
	$u_{bu2}(\%) = \frac{u_{bu}^*}{Mean_{total}} \times 100$	$u_{bu2}(\%)$	2,46	0,60
Varianza de la medida	$S_{Meas}(\%) = \frac{S_{Meas}^2}{Mean_{total}} \times 100$	$u_{Meas}(\%)$	1,52	0,48
Desviación estándar del ensayo de aptitud	$0.3 * \sigma_P$	$\sigma_P$ (µg/kg)	17,64†	0,184†

La influencia de la homogeneidad en la incertidumbre general de la medición se calculó para las estimaciones ( $u_{bu1}$ ,  $u_{bu2}$ ) y luego se comparó con la desviación estándar reportada por el organizador del ensayo de aptitud ( $\sigma_P$ ) para poder considerarla adecuadamente homogénea para las propiedades OTA y AA. Como no hay datos faltantes en el estudio donde se tuvo previsto tener 3 observaciones por submuestra, entonces,  $n_0$  ( $12-3 = 9$ ) y  $n$  ( $35-2-9=24$ ). Los grados de libertad ( $v$  MSwu). †  $S_{bu} \leq 0,3 * \sigma_P$ , si se cumple esta expresión el material se considera adecuadamente homogéneo. La homogeneidad entre unidades indica que cada 50 mg de muestra tiene el mismo valor para cada propiedad (AA y OTA). El cuadrado medio  $MS_{bu}$  es la variación entre unidades,  $MS_{wu}$  dentro de las unidades y el número de mediciones replicadas realizadas por unidad. Los valores de ANOVA de una vía calculados mostraron que  $MS_{bu} > MS_{wu}$ , lo que descartó que hubiera habido problemas de repetibilidad que necesitaran tomar acciones sobre el método. Como se muestra en la tabla, los cálculos con términos del ANOVA permitieron estimar el  $u_{bu}$ , y así se tomó como estimación de incertidumbre para la homogeneidad el valor mayor ( $S_{bu}$  o  $u_{bu}^*$ ) [67]. Se llevó a cabo el cálculo de la contribución de la homogeneidad a la incertidumbre general de la medición en términos de porcentaje y se comparó con la desviación estándar para PT ( $\sigma_P$ ) informada por el organizador de la ronda.

**Tabla A5.** Resultados de la validación intralaboratorio de los analitos seleccionados en café tostado mediante el método de preparación de muestras dSPME 'en tubo' y LC-HRMS en modo de adquisición FS-wPRM.

¶ Tiempo de retención (Ret.) con programa de elución utilizando un Accucore aQ C18 de longitud, diámetro y tamaño de partícula de 100 mm, 2,1 mm y 2,6 µm, respectivamente. La señal de cuantificación (Quant.) se escogió con el mejor aducto o producto de transición MS2 encontrado. Los cromatogramas de iones extraídos se construyeron con una ventana de extracción de masas de 5 ppm de ancho. Los fragmentos de MS2 se utilizaron para la confirmación; sin embargo, algunos pueden requerir verificación u optimización de colisión (*Check ID*). Sólo algunos pocos compuestos sin MS2 se identificaron por masa exacta y patrón isotópico; puede ser necesaria más información ortogonal para su identificación (*Quan. only*).

‡ Calibración con estándar interno triphenylphosphate (TPP), Excepto para la AA (<sup>13</sup>C-AA) y la OTA (<sup>13</sup>C-U-OTA). Rango de calibración: (2,5 – 80) ng/mL, except para la AA (200 – 6400) ng/mL.

† Recuperación individual por nivel evaluado. La recuperación en el nivel N1 está marcada con un asterisco (\*) para los compuestos que superan RSD Ri > 20 %. Los compuestos con una recuperación inaceptable (30 % >R>>150 %) están marcados con dos asteriscos (\*\*).

‡ Límite de Cuantificación (LOQ). Desviación estándar relativa (RSD) en condiciones de repetibilidad (RSDr). Los resultados de precisión y exactitud entre días se obtuvieron de una prueba de validación interna, aunque la precisión solo se muestra en el LOQ correspondiente por compuesto. Cálculo agrupado (*pooler*) durante tres días en condiciones de precisión intermedia (RSD Ri).

‡ Debido a una actualización del reglamento reciente, la OTA fue el único compuesto evaluado a 2,5 µg/kg, mostrando una recuperación del 56,7 % y RSD Ri del 20,3 %. Como los valores están en el límite de los criterios de aceptación, se dejaron en la tabla los valores en LOQ = 5 µg/kg. Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006 (Text with EEA relevance)

Compuesto (Nomenclatura siempre en inglés)	Identificación cromatográfica y de espectrometría ¶				Regresión lineal ponderada ‡ (WLS, 1/x, Niveles=6, n=3)			Recuperación a cada nivel 1 (n=4, días=3)			Precisión mostrada solo al LOQ †		
	Formula	Tiemp Ret. (min)	Señal de Cuantific. (m/z)	Fragmento de MS2	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	N1: 5 µg/kg (%)	N2: 10 µg/kg (%)	N3: 20 µg/kg (%)	LOQ (µg/kg)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>Ri</sub> (%)
1,3-diphenylurea	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	9.46	213.10224	Confirmed	4.82x10 <sup>-2</sup>	2.89x10 <sup>-2</sup>	0.9883	137.0	121.8	112.0	5	0.5	7.7
2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> NOS	15.97	214.12601	Quan only	7.11x10 <sup>-2</sup>	8.29x10 <sup>-2</sup>	0.9893	86.1 *	104.6	106.2	10	1.9	3.9
Acrylamide	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO	1.90	55.01864	Confirmed	3.43x10 <sup>-2</sup>	4.74x10 <sup>-4</sup>	0.9972	**	152.5	123.2	200	2.5	5.9
Acrylamide-d <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> D <sub>3</sub> NO	1.90	58.03744	Confirmed	2.56x10 <sup>-2</sup>	6.43x10 <sup>-4</sup>	0.9971	95.4	96.6	95.3	200	3.4	5.1
Aflatoxin-B1	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	8.10	313.07066	Confirmed	3.10x10 <sup>-2</sup>	1.63x10 <sup>-2</sup>	0.9834	128.3	104.7	96.3	5	2.8	4.8
Aflatoxin-G1	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	6.82	329.06558	Confirmed	9.12x10 <sup>-3</sup>	1.05x10 <sup>-2</sup>	0.9857	31.4	59.2	65.6	5	12.1	18.6
Akton	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS	20.95	114.96151	Confirmed	4.90x10 <sup>-3</sup>	5.60x10 <sup>-3</sup>	0.9894	98.8 *	105.5	99.7	10	2.0	6.9
Aldicarb	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	6.24	116.05285	Quan only	-4.72x10 <sup>-3</sup>	2.63x10 <sup>-2</sup>	0.9894	66.6 *	84.6	89.8	10	3.3	5.2
Allethrin	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	20.47	303.19547	Check ID	4.08x10 <sup>-2</sup>	3.04x10 <sup>-2</sup>	0.9931	52.8 *	73.8	74.4	10	6.0	6.3
Allidochlor	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> ClNO	6.47	174.06802	Quan only	-1.76x10 <sup>-2</sup>	2.68x10 <sup>-2</sup>	0.9929	61.2	55.7	71.1	5	10.7	10.2
Alloxydim	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	15.74	324.18055	Confirmed	1.40x10 <sup>-2</sup>	3.15x10 <sup>-2</sup>	0.9922	122.2 *	139.6	139.5	10	1.5	4.6

Compuesto (Nomenclatura siempre en inglés)	Identificación cromatográfica y de espectrometría §				Regresión lineal ponderada ¶ (WLS, 1/x, Niveles=6, n=3)			Recuperación a cada nivel 1 (n=4, días=3)			Precisión mostrada solo al LOQ †		
	Formula	Tiemp Ret. (min)	Señal de Cuantific. (m/z)	Fragmento de MS2	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	N1: 5 µg/kg (%)	N2: 10 µg/kg (%)	N3: 20 µg/kg (%)	LOQ (µg/kg)	RSD <sub>f</sub> (%)	RSD <sub>Ri</sub> (%)
Ametoctradin	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> N <sub>5</sub>	19.05	276.21827	Confirmed	7.97x10 <sup>-2</sup>	6.19x10 <sup>-2</sup>	0.9927	114.5 *	125.7	118.1	10	2.4	3.9
Ametryne	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> S	9.95	228.12774	Confirmed	3.85x10 <sup>-3</sup>	6.41x10 <sup>-2</sup>	0.9875	82.2	100.2	106.3	5	4.6	7.1
Amicarbazono	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	7.00	242.16115	Confirmed	6.78x10 <sup>-3</sup>	1.05x10 <sup>-2</sup>	0.9871	55.1	91.7	102.9	5	9.2	18.0
Amidosulfuron	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	8.85	370.04857	Quan only	1.70x10 <sup>-3</sup>	7.04x10 <sup>-3</sup>	0.9882	65.5	101.1	110.2	5	31.2	14.6
Anilofos	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> ClNO <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	17.28	368.03053	Confirmed	2.59x10 <sup>-2</sup>	2.76x10 <sup>-2</sup>	0.9924	87.6 *	112.3	111.1	10	3.1	5.8
Aspon	C <sub>12</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub> P <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	21.58	379.09261	Confirmed	3.81x10 <sup>-2</sup>	4.60x10 <sup>-2</sup>	0.9921	98.6 *	112.8	111.7	10	5.2	7.1
Azaconazole	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	11.42	300.03011	Confirmed	-2.75x10 <sup>-3</sup>	1.20x10 <sup>-2</sup>	0.9862	77.4	93.4	105.4	5	7.7	18.5
Azamethiphos	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> PS	7.24	324.98093	Confirmed	3.92x10 <sup>-3</sup>	1.58x10 <sup>-2</sup>	0.9879	55.9 *	79.4	83.0	10	5.8	6.9
Azimsulfuron	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S	10.73	425.10986	Confirmed	-1.55x10 <sup>-2</sup>	6.33x10 <sup>-3</sup>	0.9753	78.3	70.7	36.4	5	7.5	5.3
Azinphos-methyl	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	12.00	318.01305	Confirmed	4.90x10 <sup>-3</sup>	7.34x10 <sup>-3</sup>	0.9931	96.6	141.9	147.0	5	4.4	7.3
Aziprotryne	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> N <sub>7</sub> S	13.00	89.01711	Confirmed	5.01x10 <sup>-4</sup>	2.36x10 <sup>-3</sup>	0.9869	91.6 *	108.0	112.0	10	6.1	5.8
Beflubutamid	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> F <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	17.01	356.12682	Confirmed	1.66x10 <sup>-2</sup>	2.02x10 <sup>-2</sup>	0.9913	93.7	113.1	112.9	5	3.4	6.4
Benalaxyl	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	17.24	326.17507	Confirmed	4.81x10 <sup>-2</sup>	5.42x10 <sup>-2</sup>	0.9930	115.5 *	130.6	128.4	10	2.1	4.8
Benodanil	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> I <sub>2</sub> NO	9.64	323.98798	Confirmed	6.81x10 <sup>-3</sup>	1.83x10 <sup>-2</sup>	0.9881	85.1	96.3	98.8	5	4.8	10.6
Benoxacor	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	11.20	260.02396	Confirmed	-9.72x10 <sup>-3</sup>	7.20x10 <sup>-3</sup>	0.9884	58.2	71.9	82.9	5	7.3	4.9
Bensulfuron-methyl	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S	12.03	411.09690	Confirmed	9.62x10 <sup>-3</sup>	1.69x10 <sup>-2</sup>	0.9866	118.4	133.0	131.4	5	12.0	9.1
Bensulide	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>4</sub> PS <sub>3</sub>	16.51	398.06778	Confirmed	7.83x10 <sup>-3</sup>	9.83x10 <sup>-3</sup>	0.9898	103.5	122.5	120.2	5	5.6	4.2
Benthiavalicarb- isopropyl	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	13.58	382.15952	Quan only	2.98x10 <sup>-2</sup>	2.43x10 <sup>-2</sup>	0.9849	**	143.2	133.9	10	2.1	4.1
Benzoximate	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>5</sub>	18.35	364.09463	Confirmed	4.59x10 <sup>-3</sup>	8.05x10 <sup>-3</sup>	0.9918	67.9	99.0	97.3	5	4.5	16.6
Benzoylprop Ethyl	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	17.62	366.06583	Check ID	1.02x10 <sup>-2</sup>	2.02x10 <sup>-2</sup>	0.9915	71.6	92.7	91.9	5	9.0	15.2
Benzthiazuron	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> OS	8.38	208.05391	Confirmed	-2.37x10 <sup>-3</sup>	1.41x10 <sup>-2</sup>	0.9860	64.6	88.4	90.1	5	5.2	12.7
Bioresmethrin	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	22.57	339.19547	Confirmed	2.76x10 <sup>-2</sup>	2.93x10 <sup>-2</sup>	0.9830	63.2 *	80.2	82.5	10	11.2	8.4
Boscalid	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	13.40	343.03994	Confirmed	4.31x10 <sup>-4</sup>	5.45x10 <sup>-3</sup>	0.9906	55.7	97.9	104.6	5	5.7	15.2
Bromacil	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7.38	261.02332	Confirmed	-4.45x10 <sup>-3</sup>	2.90x10 <sup>-3</sup>	0.9887	43.6	44.5	74.0	5	3.0	8.4
Bromofenvinphos-ethyl	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> BrCl <sub>2</sub> O <sub>4</sub> P	17.84	98.98434	Confirmed	9.78x10 <sup>-4</sup>	1.11x10 <sup>-2</sup>	0.9873	91.0 *	99.5	96.6	10	0.9	4.0

Compuesto (Nomenclatura siempre en inglés)	Identificación cromatográfica y de espectrometría §				Regresión lineal ponderada ¶ (WLS, 1/x, Niveles=6, n=3)			Recuperación a cada nivel 1 (n=4, días=3)			Precisión mostrada solo al LOQ †		
	Formula	Tiemp Ret. (min)	Señal de Cuantific. (m/z)	Fragmento de MS2	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	N1: 5 µg/kg (%)	N2: 10 µg/kg (%)	N3: 20 µg/kg (%)	LOQ (µg/kg)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>ri</sub> (%)
Bromuconazole (mixture of Isomers)	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> BrCl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O	14.50	375.96136	Quan only	-3.04x10 <sup>-3</sup>	1.63x10 <sup>-3</sup>	0.9887	**	40.3	73.3	10	13.7	9.9
Bupirimate	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	14.30	166.09714	Confirmed	7.53x10 <sup>-3</sup>	7.45x10 <sup>-3</sup>	0.9849	121.2 *	137.8	134.8	10	5.4	4.8
Buprofezin	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> OS	19.70	306.16346	Confirmed	2.55x10 <sup>-2</sup>	5.27x10 <sup>-2</sup>	0.9899	75.9 *	88.8	84.9	10	5.4	4.5
Butachlor	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> ClNO <sub>2</sub>	19.16	312.17248	Quan only	-3.82x10 <sup>-2</sup>	4.51x10 <sup>-2</sup>	0.9905	87.8	102.5	106.3	5	3.0	4.7
Butylate	C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> NOS	19.39	218.15731	Quan only	4.67x10 <sup>-3</sup>	2.89x10 <sup>-2</sup>	0.9916	89.8	97.3	95.0	5	6.5	5.4
Cadusafos	C <sub>10</sub> H <sub>23</sub> O <sub>2</sub> PS <sub>2</sub>	18.63	271.09498	Confirmed	5.71x10 <sup>-2</sup>	7.11x10 <sup>-2</sup>	0.9922	99.5	108.3	106.4	5	6.4	4.8
Carbaryl	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	8.68	145.06479	Confirmed	2.25x10 <sup>-2</sup>	1.50x10 <sup>-2</sup>	0.9895	130.0	113.3	104.6	5	6.8	6.5
Carbendazim	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	4.64	192.07675	Quan only	-2.01x10 <sup>-2</sup>	4.32x10 <sup>-2</sup>	0.9857	**	46.9	74.6	10	22.8	16.7
Carboxine	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> S	8.44	236.07398	Confirmed	2.80x10 <sup>-2</sup>	2.76x10 <sup>-2</sup>	0.9876	95.4 *	100.5	93.0	10	6.3	4.5
Carfentrazone-ethyl	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	16.37	412.04371	Confirmed	-1.96x10 <sup>-3</sup>	8.43x10 <sup>-4</sup>	0.9898	85.1	95.7	97.4	5	6.3	7.9
Carpropamid	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>3</sub> NO	17.16	139.03059	Confirmed	1.76x10 <sup>-2</sup>	1.72x10 <sup>-2</sup>	0.9927	98.6 *	115.6	114.3	10	4.2	4.6
Chlorbromuron	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> BrClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	13.41	292.96869	Confirmed	-1.32x10 <sup>-3</sup>	7.45x10 <sup>-3</sup>	0.9917	57.4	91.3	94.8	5	15.5	12.8
Chlorfenvinphos (mixture Isomers)	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	17.43	358.97681	Confirmed	1.30x10 <sup>-2</sup>	1.51x10 <sup>-2</sup>	0.9925	84.2	101.8	102.0	5	5.6	5.2
Chloridazon	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>3</sub> O	5.47	222.04287	Confirmed	-6.57x10 <sup>-3</sup>	8.11x10 <sup>-3</sup>	0.9892	**	21.4	59.2	10	10.8	7.1
Chlorimuron Ethyl	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S	13.83	415.04736	Confirmed	1.74x10 <sup>-3</sup>	6.28x10 <sup>-3</sup>	0.9903	108.1	132.6	133.5	5	4.9	8.9
Chloroxuron	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	15.05	291.08948	Confirmed	3.25x10 <sup>-2</sup>	2.78x10 <sup>-2</sup>	0.9907	96.3	108.4	110.5	5	5.9	6.4
Chlorpyrifos	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	20.96	349.93356	Confirmed	3.43x10 <sup>-3</sup>	8.05x10 <sup>-3</sup>	0.9893	70.5 *	97.2	94.6	10	4.4	7.6
Chlorpyrifos-methyl	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	18.87	321.90226	Confirmed	-3.50x10 <sup>-3</sup>	9.48x10 <sup>-4</sup>	0.9788	103.6	116.3	108.4	5	5.7	9.6
Chlorpyrifos-oxon	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>4</sub> P	15.77	333.95640	Confirmed	5.99x10 <sup>-3</sup>	1.32x10 <sup>-2</sup>	0.9909	93.8	110.0	111.8	5	7.8	5.2
Chromafenozide	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	15.02	395.23292	Quan only	1.28x10 <sup>-2</sup>	1.55x10 <sup>-2</sup>	0.9907	91.8	110.9	111.7	5	6.4	4.8
Cinosulfuron	C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> S	7.25	414.10780	Quan only	-7.87x10 <sup>-3</sup>	9.52x10 <sup>-3</sup>	0.9856	62.8	75.5	81.9	5	9.3	13.7
Clethodim	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> ClNO <sub>3</sub> S	19.42	360.13947	Check ID	1.01x10 <sup>-3</sup>	9.75x10 <sup>-3</sup>	0.9925	92.2	108.6	110.3	5	7.5	5.3
Climbazol	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10.50	293.10513	Confirmed	1.32x10 <sup>-2</sup>	3.23x10 <sup>-2</sup>	0.9893	112.5	135.8	127.0	5	13.7	9.5
Clodinafop-propargyl	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> ClFNO <sub>4</sub>	16.55	350.05899	Confirmed	1.62x10 <sup>-2</sup>	1.92x10 <sup>-2</sup>	0.9916	74.7	92.8	95.7	5	4.6	4.3
Clofentezine	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	19.06	138.01036	Confirmed	3.33x10 <sup>-3</sup>	2.70x10 <sup>-3</sup>	0.9935	59.3 *	81.6	88.7	10	3.9	3.6

Compuesto (Nomenclatura siempre en inglés)	Identificación cromatográfica y de espectrometría §				Regresión lineal ponderada ¶ (WLS, 1/x, Niveles=6, n=3)			Recuperación a cada nivel 1 (n=4, días=3)			Precisión mostrada solo al LOQ †		
	Formula	Tiemp Ret. (min)	Señal de Cuantific. (m/z)	Fragmento de MS2	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	N1: 5 µg/kg (%)	N2: 10 µg/kg (%)	N3: 20 µg/kg (%)	LOQ (µg/kg)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>ri</sub> (%)
Clomazone	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> ClNO <sub>2</sub>	11.63	240.07858	Confirmed	-1.99x10 <sup>-2</sup>	3.20x10 <sup>-2</sup>	0.9862	35.4	77.5	92.9	5	11.6	6.8
Clomeprop	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	20.38	324.05526	Quan only	4.04x10 <sup>-3</sup>	1.12x10 <sup>-2</sup>	0.9902	**	38.3	45.4	10	9.3	8.5
Cloquintocet-mexyl	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>3</sub>	20.93	336.13610	Confirmed	5.44x10 <sup>-2</sup>	5.66x10 <sup>-2</sup>	0.9902	114.5 *	126.5	122.2	10	15.8	10.4
Cloransulam-methyl	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> ClFN <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S	8.47	430.03827	Quan only	-2.28x10 <sup>-3</sup>	4.43x10 <sup>-3</sup>	0.9871	36.9	86.1	97.5	5	19.0	10.0
Coumaphos	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> ClO <sub>5</sub> PS	17.87	363.02174	Confirmed	1.06x10 <sup>-2</sup>	1.63x10 <sup>-2</sup>	0.9912	66.5	86.8	87.7	5	10.5	11.8
Coumaphos Oxon	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> ClO <sub>6</sub> P	12.28	347.04458	Confirmed	5.12x10 <sup>-3</sup>	1.64x10 <sup>-2</sup>	0.9876	68.2 *	93.9	105.2	10	4.6	18.2
Crimidine	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>3</sub>	6.38	172.06360	Quan only	-6.02x10 <sup>-2</sup>	3.78x10 <sup>-2</sup>	0.9832	67.1	49.3	66.2	5	6.7	8.2
Crotoxyphos	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> P	13.26	332.12575	Confirmed	1.84x10 <sup>-2</sup>	2.40x10 <sup>-2</sup>	0.9915	125.0	134.3	128.6	5	5.7	4.4
Cumyluron	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> O	14.37	303.12587	Confirmed	4.28x10 <sup>-2</sup>	2.74x10 <sup>-2</sup>	0.9878	67.2 *	118.4	123.7	10	8.0	9.8
Cyazofamid	C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	15.58	325.05205	Confirmed	1.12x10 <sup>-2</sup>	1.60x10 <sup>-2</sup>	0.9927	87.1	104.0	104.3	5	6.2	8.1
Cybutryne	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> S	13.62	254.14339	Quan only	6.14x10 <sup>-2</sup>	7.21x10 <sup>-2</sup>	0.9864	100.5	115.4	115.5	5	6.5	5.1
Cyclosulfamuron	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S	15.28	422.11288	Confirmed	8.34x10 <sup>-3</sup>	1.46x10 <sup>-2</sup>	0.9911	116.8	131.8	135.3	5	9.1	11.2
Cycloxdim	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub> S	19.24	326.17844	Check ID	4.66x10 <sup>-3</sup>	1.48x10 <sup>-2</sup>	0.9881	93.4	112.0	114.2	5	9.9	8.5
Cycluron	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O	10.86	199.18049	Quan only	6.68x10 <sup>-2</sup>	6.24x10 <sup>-2</sup>	0.9887	97.3	106.1	104.8	5	5.5	6.4
Cyflufenamid	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> F <sub>5</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	18.28	413.12830	Confirmed	1.21x10 <sup>-2</sup>	2.07x10 <sup>-2</sup>	0.9930	81.9	99.4	97.3	5	3.2	9.8
Cyhalofop-butyl	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> FNO <sub>4</sub>	23.02	380.12686	Quan only	-1.62x10 <sup>-3</sup>	3.57x10 <sup>-3</sup>	0.9912	**	35.9	44.1	10	21.3	9.4
Cymiazole	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> S	5.43	219.09505	Check ID	-9.78x10 <sup>-2</sup>	3.63x10 <sup>-2</sup>	0.9314	**	90.0	80.4	10	10.1	10.5
Cypermethrin (mix Of Isomers)	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	22.09	433.10802	Check ID	-3.46x10 <sup>-3</sup>	4.43x10 <sup>-3</sup>	0.9899	**	42.2	46.0	10	7.4	13.0
Cyphenothrin	C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	22.45	376.19072	Check ID	-9.74x10 <sup>-4</sup>	2.00x10 <sup>-3</sup>	0.9810	**	26.0	44.9	10	15.5	11.9
Cyproconazole	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O	15.82	292.12112	Confirmed	4.42x10 <sup>-3</sup>	1.27x10 <sup>-2</sup>	0.9917	85.3	107.5	118.3	5	3.9	12.1
Cyprodinil	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub>	15.90	226.13387	Quan only	2.99x10 <sup>-2</sup>	7.10x10 <sup>-2</sup>	0.9916	82.4	91.1	92.5	5	2.2	6.2
Cyprofuram	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> ClNO <sub>3</sub>	8.71	280.07350	Confirmed	1.01x10 <sup>-2</sup>	2.28x10 <sup>-2</sup>	0.9891	78.3 *	94.7	97.9	10	4.6	4.0
Cyprosulfamide	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S	7.63	375.10092	Quan only	-4.26x10 <sup>-3</sup>	4.01x10 <sup>-3</sup>	0.9850	**	38.2	80.2	10	27.2	13.1
Daimuron	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O	13.68	269.16484	Confirmed	6.69x10 <sup>-2</sup>	4.54x10 <sup>-2</sup>	0.9834	121.7	137.1	132.2	5	7.2	6.0
Demeton-O	C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	11.51	259.05860	Check ID	2.24x10 <sup>-2</sup>	1.20x10 <sup>-2</sup>	0.9898	**	135.8	115.6	10	2.4	4.7

Compuesto (Nomenclatura siempre en inglés)	Identificación cromatográfica y de espectrometría §				Regresión lineal ponderada ¶ (WLS, 1/x, Niveles=6, n=3)			Recuperación a cada nivel 1 (n=4, días=3)			Precisión mostrada solo al LOQ †		
	Formula	Tiemp Ret. (min)	Señal de Cuantific. (m/z)	Fragmento de MS2	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	N1: 5 µg/kg (%)	N2: 10 µg/kg (%)	N3: 20 µg/kg (%)	LOQ (µg/kg)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>ri</sub> (%)
Demeton-S-methyl	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	7.87	231.02730	Quan only	-8.35x10 <sup>-3</sup>	4.26x10 <sup>-3</sup>	0.9846	**	36.3	60.7	10	8.9	6.5
Demeton-S-Methyl-Sulfone	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> O <sub>5</sub> PS <sub>2</sub>	4.45	263.01713	Quan only	7.37x10 <sup>-3</sup>	2.14x10 <sup>-2</sup>	0.9894	**	21.1	31.0	10	19.2	10.8
Desmedipham	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	11.26	136.03909	Check ID	2.70x10 <sup>-2</sup>	2.98x10 <sup>-2</sup>	0.9831	**	37.3	37.2	10	6.7	6.3
Desmethyl-formamido-pirimicarb	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	7.62	253.12952	Confirmed	3.63x10 <sup>-2</sup>	3.61x10 <sup>-2</sup>	0.9897	104.2 *	115.3	110.9	10	1.9	3.7
Desmetryn	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> S	8.07	214.11209	Confirmed	3.65x10 <sup>-2</sup>	1.13x10 <sup>-1</sup>	0.9873	85.7	100.9	104.7	5	6.1	6.0
Dialifos	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> ClNO <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>	18.86	394.00979	Confirmed	1.10x10 <sup>-2</sup>	1.19x10 <sup>-2</sup>	0.9927	44.7	67.0	67.9	5	8.0	6.8
Diazinon	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	17.22	305.10833	Confirmed	3.62x10 <sup>-2</sup>	3.88x10 <sup>-2</sup>	0.9902	105.4	125.7	131.5	5	5.9	4.4
Dichlormid	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO	7.57	208.02905	Confirmed	-6.74x10 <sup>-3</sup>	1.60x10 <sup>-2</sup>	0.9924	62.5	85.7	91.6	5	7.7	5.4
Dichlorvos	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>4</sub> P	7.51	220.95318	Confirmed	-3.74x10 <sup>-3</sup>	1.23x10 <sup>-2</sup>	0.9925	73.9	105.8	108.9	5	11.0	6.3
Diclobutrazol	C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O	16.45	328.09779	Confirmed	3.02x10 <sup>-3</sup>	1.10x10 <sup>-2</sup>	0.9916	114.0	130.0	126.9	5	3.7	4.1
Diclocymet	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	15.79	172.99158	Confirmed	-1.01x10 <sup>-3</sup>	3.61x10 <sup>-3</sup>	0.8908	98.0 *	111.6	110.9	10	7.3	5.4
Diclosulam	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S	9.03	405.99382	Quan only	-4.55x10 <sup>-3</sup>	2.22x10 <sup>-3</sup>	0.9911	**	53.0	79.9	10	15.3	13.4
Diethyl-ethyl	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>3</sub>	16.01	312.13610	Confirmed	8.32x10 <sup>-3</sup>	3.95x10 <sup>-2</sup>	0.9915	89.2	103.5	109.3	5	7.3	6.6
Diethofencarb	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	11.84	268.15433	Confirmed	2.87x10 <sup>-2</sup>	2.73x10 <sup>-2</sup>	0.9885	126.8 *	135.7	124.1	10	4.9	5.1
Difenconazole (mixture of isomers)	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	19.25	406.07197	Confirmed	-1.47x10 <sup>-2</sup>	9.03x10 <sup>-3</sup>	0.9845	63.4	61.9	55.5	5	3.9	4.6
Diflubenzuron	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> ClF <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	16.36	311.03934	Confirmed	2.32x10 <sup>-3</sup>	5.72x10 <sup>-3</sup>	0.9893	64.9	108.3	108.5	5	26.8	12.3
Diflufenican	C <sub>19</sub> H <sub>11</sub> F <sub>5</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	19.69	266.04169	Confirmed	6.29x10 <sup>-4</sup>	1.10x10 <sup>-3</sup>	0.9916	80.8 *	98.7	90.2	10	7.6	5.5
Dimepiperate	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NOS	18.94	264.14166	Confirmed	1.65x10 <sup>-2</sup>	1.69x10 <sup>-2</sup>	0.9896	75.5 *	96.8	97.7	10	3.4	4.3
Dimethachlor	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>2</sub>	10.76	256.10988	Confirmed	-4.91x10 <sup>-2</sup>	3.71x10 <sup>-2</sup>	0.9816	77.3	85.5	88.3	5	4.6	4.3
Dimethametryn	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> S	14.50	256.15904	Quan only	1.51x10 <sup>-1</sup>	1.51x10 <sup>-1</sup>	0.9898	100.9 *	117.5	117.3	10	2.6	4.1
Dimethenamid	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>2</sub> S	12.34	276.08195	Confirmed	7.55x10 <sup>-3</sup>	3.56x10 <sup>-2</sup>	0.9899	45.5 *	98.2	108.0	10	6.9	17.6
Dimethoate	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	5.29	230.00690	Confirmed	-7.09x10 <sup>-3</sup>	1.90x10 <sup>-2</sup>	0.9901	**	74.0	81.3	10	9.0	11.2
Dimethomorph	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>4</sub>	14.07	388.13101	Quan only	-1.86x10 <sup>-3</sup>	6.36x10 <sup>-3</sup>	0.9880	61.5	102.7	116.2	5	18.3	14.2
Dimethylvinphos	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	14.32	127.01542	Confirmed	2.24x10 <sup>-2</sup>	1.88x10 <sup>-2</sup>	0.9887	111.5 *	129.2	128.3	10	4.1	4.9
Dimetilan	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	5.55	241.12952	Quan only	3.97x10 <sup>-2</sup>	5.43x10 <sup>-2</sup>	0.9900	49.5 *	75.1	76.9	10	6.1	6.0

Compuesto (Nomenclatura siempre en inglés)	Identificación cromatográfica y de espectrometría §				Regresión lineal ponderada ‡ (WLS, 1/x, Niveles=6, n=3)			Recuperación a cada nivel 1 (n=4, días=3)			Precisión mostrada solo al LOQ †		
	Formula	Tiemp Ret. (min)	Señal de Cuantific. (m/z)	Fragmento de MS2	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	N1: 5 µg/kg (%)	N2: 10 µg/kg (%)	N3: 20 µg/kg (%)	LOQ (µg/kg)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>ri</sub> (%)
Dimoxystrobin	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	16.28	327.17032	Confirmed	5.31x10 <sup>-2</sup>	5.26x10 <sup>-2</sup>	0.9933	131.4 *	149.4	145.6	10	2.7	4.1
Diniconazole	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O	18.54	326.08214	Confirmed	4.69x10 <sup>-3</sup>	1.88x10 <sup>-2</sup>	0.9924	91.3	106.0	104.5	5	5.1	4.4
Dioxathion	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub> P <sub>2</sub> S <sub>4</sub>	20.19	271.02221	Quan only	-3.04x10 <sup>-2</sup>	2.71x10 <sup>-2</sup>	0.9499	32.2	41.6	42.4	5	4.9	12.2
Diphenamid	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> NO	11.03	240.13829	Confirmed	3.48x10 <sup>-2</sup>	6.87x10 <sup>-2</sup>	0.9894	115.7 *	126.1	121.9	10	3.0	4.0
Dipropetryn	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> S	14.50	256.15904	Check ID	1.51x10 <sup>-1</sup>	1.51x10 <sup>-1</sup>	0.9898	100.9 *	117.5	117.3	10	2.6	4.1
Disulfoton Sulfone	C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>3</sub>	9.59	307.02558	Confirmed	7.64x10 <sup>-3</sup>	2.17x10 <sup>-2</sup>	0.9887	96.3 *	112.5	111.5	10	3.0	3.4
Disulfoton Sulfoxide	C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>3</sub>	9.54	291.03067	Confirmed	2.50x10 <sup>-2</sup>	3.21x10 <sup>-2</sup>	0.9891	107.7 *	125.8	122.5	10	2.8	3.6
Dithiopyr	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> F <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	19.53	402.06154	Confirmed	-2.35x10 <sup>-3</sup>	2.97x10 <sup>-3</sup>	0.9895	43.9	94.2	101.5	5	22.5	14.8
Diuron	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	11.11	233.02429	Confirmed	5.75x10 <sup>-3</sup>	2.14x10 <sup>-2</sup>	0.9891	46.4	81.8	88.5	5	23.5	11.9
DMST	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	7.86	215.08487	Check ID	-6.76x10 <sup>-2</sup>	2.27x10 <sup>-2</sup>	0.9860	**	43.6	40.9	10	12.5	8.6
Dyfonate	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> OPS <sub>2</sub>	17.11	247.03747	Confirmed	-6.35x10 <sup>-3</sup>	8.99x10 <sup>-3</sup>	0.9857	94.7	121.9	116.1	5	9.3	5.2
Edifenphos	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> PS <sub>2</sub>	17.28	311.03238	Confirmed	5.38x10 <sup>-2</sup>	4.93x10 <sup>-2</sup>	0.9925	64.9 *	89.3	92.4	10	4.9	5.4
Epoxiconazole (iso)	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> ClFN <sub>3</sub> O	15.82	330.08039	Confirmed	1.06x10 <sup>-2</sup>	1.58x10 <sup>-2</sup>	0.9910	111.6	119.7	118.4	5	10.7	8.8
Esprocarb	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> NOS	20.12	266.15731	Quan only	6.20x10 <sup>-2</sup>	5.34x10 <sup>-2</sup>	0.9919	41.6 *	62.5	66.8	10	7.6	6.4
Etaconazole	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	15.64	328.06141	Confirmed	2.10x10 <sup>-3</sup>	1.23x10 <sup>-2</sup>	0.9875	88.2	104.6	108.4	5	6.6	6.5
Ethaboxam	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> OS <sub>2</sub>	9.09	321.08383	Confirmed	-1.14x10 <sup>-2</sup>	6.23x10 <sup>-3</sup>	0.9849	51.0 *	50.1	47.8	10	23.4	11.7
Ethametsulfuron- methyl	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S	9.58	411.10813	Quan only	1.46x10 <sup>-2</sup>	1.27x10 <sup>-2</sup>	0.9861	147.6	145.9	138.8	5	1.9	5.2
Ethion	C <sub>9</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> P <sub>2</sub> S <sub>4</sub>	20.67	384.99489	Confirmed	1.69x10 <sup>-2</sup>	2.83x10 <sup>-2</sup>	0.9906	78.4	86.5	87.5	5	8.4	6.6
Ethiozin	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> OS	8.09	229.11176	Confirmed	-5.04x10 <sup>-3</sup>	3.15x10 <sup>-2</sup>	0.9890	34.8 *	69.6	81.7	10	6.3	6.1
Ethiprole	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>3</sub> N <sub>4</sub> OS	12.61	396.98990	Quan only	-3.03x10 <sup>-3</sup>	2.73x10 <sup>-3</sup>	0.9864	35.0	83.3	97.2	5	24.0	11.6
Ethoxysulfuron	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S	14.23	399.09690	Quan only	7.23x10 <sup>-3</sup>	1.04x10 <sup>-2</sup>	0.9891	130.5		150.7	5	3.9	5.3
Ethychlozate	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	11.75	239.05818	Confirmed	-2.46x10 <sup>-3</sup>	1.59x10 <sup>-2</sup>	0.9887	61.7	97.4	102.1	5	15.8	18.4
Etobenzanid	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	17.70	340.05018	Confirmed	2.44x10 <sup>-3</sup>	1.27x10 <sup>-2</sup>	0.9908	66.0	85.7	83.6	5	8.4	7.4
Etofenprox	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	23.20	394.23767	Confirmed	5.51x10 <sup>-3</sup>	3.37x10 <sup>-2</sup>	0.9922	75.6	80.8	76.7	5	5.3	7.6
Etoazole	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> F <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	21.56	360.17696	Confirmed	1.30x10 <sup>-1</sup>	8.41x10 <sup>-2</sup>	0.9920	133.3	133.8	129.0	5	5.6	5.1

Compuesto (Nomenclatura siempre en inglés)	Identificación cromatográfica y de espectrometría §				Regresión lineal ponderada ¶ (WLS, 1/x, Niveles=6, n=3)			Recuperación a cada nivel 1 (n=4, días=3)			Precisión mostrada solo al LOQ †		
	Formula	Tiemp Ret. (min)	Señal de Cuantific. (m/z)	Fragmento de MS2	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	N1: 5 µg/kg (%)	N2: 10 µg/kg (%)	N3: 20 µg/kg (%)	LOQ (µg/kg)	RSD <sub>f</sub> (%)	RSD <sub>ri</sub> (%)
Etrifos	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> PS	16.69	293.07194	Confirmed	1.55x10 <sup>-2</sup>	6.26x10 <sup>-2</sup>	0.9868	111.8 *	128.7	125.9	10	2.4	3.5
Famoxadone	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	18.09	392.16048	Confirmed	-4.17x10 <sup>-3</sup>	2.36x10 <sup>-3</sup>	0.9919	**	36.5	40.2	10	10.7	15.5
Famphur	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>5</sub> PS <sub>2</sub>	10.05	326.02803	Quan only	1.07x10 <sup>-2</sup>	2.13x10 <sup>-2</sup>	0.9873	96.4 *	112.3	113.7	10	3.6	3.7
Fenamidone	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> OS	12.65	312.11651	Confirmed	-1.21x10 <sup>-2</sup>	1.77x10 <sup>-2</sup>	0.9901	**	86.2	119.3	10	4.2	10.5
Fenamiphos	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>3</sub> PS	16.04	304.11308	Confirmed	6.04x10 <sup>-2</sup>	4.79x10 <sup>-2</sup>	0.9917	99.4	111.1	113.1	5	3.8	3.9
Fenamiphos-sulfone	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>5</sub> PS	8.37	336.10291	Quan only	5.62x10 <sup>-3</sup>	1.37x10 <sup>-2</sup>	0.9828	75.5	91.1	99.2	5	7.1	6.2
Fenamiphos-sulfoxide	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>4</sub> PS	8.15	320.10799	Confirmed	2.08x10 <sup>-2</sup>	1.94x10 <sup>-2</sup>	0.9846	**	53.5	56.7	10	10.2	6.2
Fenarimol	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	14.99	331.03994	Confirmed	-1.59x10 <sup>-4</sup>	5.81x10 <sup>-3</sup>	0.9912	58.4	99.7	106.5	5	9.2	11.1
Fenazaquin	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O	23.00	307.18049	Confirmed	3.73x10 <sup>-2</sup>	9.65x10 <sup>-2</sup>	0.9927	60.6 *	72.5	69.1	10	5.5	4.4
Fenbuconazole	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub>	16.16	337.12145	Confirmed	3.80x10 <sup>-3</sup>	1.10x10 <sup>-2</sup>	0.9897	88.3	105.4	105.1	5	6.5	7.2
Fenclorazol-ethyl	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	17.97	401.91319	Confirmed	1.21x10 <sup>-3</sup>	6.50x10 <sup>-3</sup>	0.9912	**	54.0	57.4	10	6.9	14.8
Fenhexamid	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	14.37	302.07091	Confirmed	-1.50x10 <sup>-4</sup>	6.40x10 <sup>-3</sup>	0.9894	61.0	89.0	97.8	5	8.1	7.5
Fenobucarb	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>	11.73	208.13321	Check ID	2.53x10 <sup>-2</sup>	4.27x10 <sup>-2</sup>	0.9874	132.3	123.6	115.8	5	5.8	5.4
Fenoxanil	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	15.97	329.08181	Confirmed	-2.07x10 <sup>-2</sup>	1.45x10 <sup>-2</sup>	0.9696	71.2	68.9	70.4	5	4.7	7.4
Fenoxaprop	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> ClNO <sub>5</sub>	15.76	277.89297	Confirmed	1.79x10 <sup>-4</sup>	6.37x10 <sup>-3</sup>	0.9901	117.1 *	119.3	114.3	10	2.2	3.5
Fenoxaprop-ethyl	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> ClNO <sub>5</sub>	19.96	362.07898	Confirmed	2.10x10 <sup>-2</sup>	2.37x10 <sup>-2</sup>	0.9907	**	54.2	57.3	10	11.3	8.1
Fenoxycarb	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>4</sub>	12.35	302.13868	Quan only	3.40x10 <sup>-2</sup>	4.61x10 <sup>-2</sup>	0.9927	128.6	133.0	132.8	5	10.5	6.8
Fenpiclonil	C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	12.12	236.99808	Confirmed	-3.25x10 <sup>-3</sup>	1.52x10 <sup>-3</sup>	0.9851	**	42.2	73.0	10	11.3	14.7
Fenpropidin	C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> N	11.66	274.25293	Confirmed	1.96x10 <sup>-2</sup>	6.62x10 <sup>-2</sup>	0.9885	75.6 *	82.6	75.6	10	4.5	4.4
Fenpropimorph	C <sub>20</sub> H <sub>33</sub> NO	12.03	304.26349	Confirmed	1.68x10 <sup>-2</sup>	4.80x10 <sup>-2</sup>	0.9871	85.2 *	97.0	91.1	10	4.3	4.9
Fenpyroximate	C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	22.05	422.20743	Check ID	1.70x10 <sup>-2</sup>	1.97x10 <sup>-2</sup>	0.9857	89.1	95.1	96.6	5	6.3	4.5
Fensulfothion	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>	10.78	309.03786	Confirmed	3.01x10 <sup>-2</sup>	2.92x10 <sup>-2</sup>	0.9885	100.5 *	118.0	117.3	10	4.0	4.1
Fensulfothion-oxon	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> O <sub>5</sub> PS	6.38	293.06071	Check ID	6.09x10 <sup>-3</sup>	1.98x10 <sup>-2</sup>	0.9847	**	28.9	37.0	10	4.7	4.7
Fensulfothion-oxon-sulfone	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> O <sub>6</sub> PS	6.47	309.05562	Confirmed	2.08x10 <sup>-3</sup>	1.06x10 <sup>-2</sup>	0.9892	56.9 *	81.5	89.2	10	6.5	5.5
Fensulfothion-sulfone	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> O <sub>5</sub> PS <sub>2</sub>	11.00	325.03278	Check ID	3.62x10 <sup>-3</sup>	1.24x10 <sup>-2</sup>	0.9901	79.9	99.8	101.8	5	7.8	9.6

Compuesto (Nomenclatura siempre en inglés)	Identificación cromatográfica y de espectrometría §				Regresión lineal ponderada ¶ (WLS, 1/x, Niveles=6, n=3)			Recuperación a cada nivel 1 (n=4, días=3)			Precisión mostrada solo al LOQ †		
	Formula	Tiemp Ret. (min)	Señal de Cuantific. (m/z)	Fragmento de MS2	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	N1: 5 µg/kg (%)	N2: 10 µg/kg (%)	N3: 20 µg/kg (%)	LOQ (µg/kg)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>ri</sub> (%)
Fenthion	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	17.28	279.02730	Confirmed	-3.03x10 <sup>-3</sup>	3.84x10 <sup>-3</sup>	0.9903	**	79.6	101.9	10	6.7	8.6
Fenthion Oxon	C <sub>7</sub> O <sub>15</sub> O <sub>4</sub> PS	11.95	263.05014	Confirmed	3.13x10 <sup>-2</sup>	4.56x10 <sup>-2</sup>	0.9894	94.5 *	111.2	111.4	10	2.3	3.4
Fenthion Sulfoxide	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>	8.78	295.02221	Confirmed	1.45x10 <sup>-2</sup>	2.31x10 <sup>-2</sup>	0.9880	86.4 *	103.2	102.9	10	1.4	4.5
Fenthion-ethyl	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	19.92	307.05860	Quan only	1.19x10 <sup>-2</sup>	1.61x10 <sup>-2</sup>	0.9931	34.5	67.5	71.0	5	14.6	16.8
Fenthion-sulfone	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>5</sub> PS <sub>2</sub>	9.08	311.01713	Confirmed	-5.80x10 <sup>-4</sup>	6.79x10 <sup>-3</sup>	0.9881	50.6	88.3	96.4	5	15.9	13.5
Fenthion-sulfoxide	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>	8.78	295.02221	Confirmed	1.45x10 <sup>-2</sup>	2.31x10 <sup>-2</sup>	0.9880	86.4 *	103.2	102.9	10	1.4	4.5
Ferimzone 1	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub>	9.50	255.16042	Confirmed	5.00x10 <sup>-2</sup>	3.22x10 <sup>-2</sup>	0.9901	122.1	148.5	139.7	5	9.5	15.6
Ferimzone 2	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub>	10.85	255.16042	Confirmed	6.30x10 <sup>-2</sup>	4.68x10 <sup>-2</sup>	0.9897	123.1	130.1	114.9	5	5.5	7.8
Flamprop Isopropyl	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> ClFNO <sub>3</sub>	17.35	105.03368	Confirmed	4.66x10 <sup>-2</sup>	7.58x10 <sup>-2</sup>	0.9918	86.5 *	99.8	98.4	10	3.6	4.4
Flamprop-methyl (metavane)	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> ClFNO <sub>3</sub>	14.14	105.03367	Confirmed	2.70x10 <sup>-2</sup>	2.85x10 <sup>-2</sup>	0.9887	116.6 *	126.1	122.6	10	2.6	5.1
Flamprop-M-isopropyl	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> ClFNO <sub>3</sub>	17.35	105.03368	Confirmed	4.66x10 <sup>-2</sup>	7.58x10 <sup>-2</sup>	0.9918	86.5 *	99.8	98.4	10	3.6	4.4
Flazasulfuron	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S	11.73	182.05583	Confirmed	5.53x10 <sup>-3</sup>	1.05x10 <sup>-2</sup>	0.9856	126.4 *	134.4	129.1	10	3.2	3.6
Florasulam	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S	6.07	360.03727	Quan only	-5.25x10 <sup>-3</sup>	3.31x10 <sup>-3</sup>	0.9922	47.7 *	62.2	89.1	10	13.9	13.2
Fluacrypyrim	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	18.92	427.14753	Quan only	1.57x10 <sup>-2</sup>	2.56x10 <sup>-2</sup>	0.9898	112.9 *	131.9	124.4	10	3.5	4.5
Fluazifop	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	18.54	328.07912	Confirmed	3.00x10 <sup>-3</sup>	1.18x10 <sup>-2</sup>	0.9924	74.7 *	95.5	101.4	10	7.0	8.8
Fluazifop-Butyl	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	20.10	384.14172	Confirmed	7.03x10 <sup>-2</sup>	6.53x10 <sup>-2</sup>	0.9937	55.8 *	72.8	74.5	10	5.9	5.6
Flufenacet	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> F <sub>4</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	14.84	364.07374	Confirmed	2.59x10 <sup>-2</sup>	2.84x10 <sup>-2</sup>	0.9900	101.9	113.3	116.5	5	5.4	7.7
Flumetsulam	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> F <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S	5.07	326.05178	Quan only	-9.36x10 <sup>-3</sup>	5.46x10 <sup>-3</sup>	0.9868	**	42.2	61.3	10	13.1	14.8
Flumorph	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> FNO <sub>4</sub>	11.49	285.09125	Confirmed	7.49x10 <sup>-3</sup>	1.20x10 <sup>-2</sup>	0.9859	101.7 *	120.0	115.7	10	0.9	4.2
Fluometuron	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O	9.22	233.08962	Confirmed	1.45x10 <sup>-2</sup>	3.58x10 <sup>-2</sup>	0.9902	**	110.5	104.4	10	7.7	5.2
Fluopicolide	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>3</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O	13.36	382.97271	Quan only	4.03x10 <sup>-4</sup>	9.28x10 <sup>-3</sup>	0.9906	77.6	100.0	103.9	5	8.8	11.6
Fluopyram	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> ClF <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O	14.53	397.05369	Quan only	1.52x10 <sup>-2</sup>	2.15x10 <sup>-2</sup>	0.9906	100.1	113.9	114.7	5	6.5	6.4
Fluquinconazole	C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>5</sub> O	14.75	376.01627	Quan only	-3.91x10 <sup>-3</sup>	2.05x10 <sup>-3</sup>	0.9875	**	57.0	83.6	10	14.7	14.7
Fluridone	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> F <sub>3</sub> NO	12.22	330.11003	Confirmed	3.27x10 <sup>-2</sup>	4.40x10 <sup>-2</sup>	0.9882	129.8 *	144.4	142.3	10	0.8	4.1
Fluroxypyr	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	21.38	254.97340	Quan only	4.56x10 <sup>-4</sup>	2.62x10 <sup>-3</sup>	0.9902	**	39.7	61.2	10	21.8	13.8

Compuesto (Nomenclatura siempre en inglés)	Identificación cromatográfica y de espectrometría §				Regresión lineal ponderada ¶ (WLS, 1/x, Niveles=6, n=3)			Recuperación a cada nivel 1 (n=4, días=3)			Precisión mostrada solo al LOQ †		
	Formula	Tiemp Ret. (min)	Señal de Cuantific. (m/z)	Fragmento de MS2	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	N1: 5 µg/kg (%)	N2: 10 µg/kg (%)	N3: 20 µg/kg (%)	LOQ (µg/kg)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>ri</sub> (%)
Flurprimidol	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	13.65	313.11584	Confirmed	-1.58x10 <sup>-2</sup>	1.26x10 <sup>-2</sup>	0.9909	63.1	66.5	108.9	5	6.6	12.9
Flurtamone	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	12.83	334.10494	Confirmed	4.89x10 <sup>-2</sup>	3.49x10 <sup>-2</sup>	0.9879	143.7 *	146.5	137.5	10	1.5	4.1
Flusilazole	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> Si	16.50	316.10761	Confirmed	-3.74x10 <sup>-3</sup>	1.75x10 <sup>-2</sup>	0.9901	39.4	92.7	105.0	5	23.2	16.2
Fluthiacet-methyl	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> ClFN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	17.09	404.03002	Confirmed	6.13x10 <sup>-3</sup>	1.24x10 <sup>-2</sup>	0.9896	76.8	103.3	100.0	5	10.2	7.0
Flutolanil	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	13.51	324.12059	Confirmed	3.92x10 <sup>-2</sup>	3.06x10 <sup>-2</sup>	0.9874	131.5 *	135.9	123.7	10	5.9	4.6
Flutriafol	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O	9.91	302.10995	Confirmed	-2.04x10 <sup>-2</sup>	1.33x10 <sup>-2</sup>	0.9870	46.4 *	62.9	114.2	10	12.1	17.8
Forchlorfenuron	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>3</sub> O	10.96	248.05852	Confirmed	2.15x10 <sup>-3</sup>	8.81x10 <sup>-3</sup>	0.9869	78.2	104.7	108.3	5	5.9	9.8
Fosthiazate	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	9.04	284.05385	Confirmed	2.89x10 <sup>-2</sup>	4.20x10 <sup>-2</sup>	0.9905	117.0 *	128.0	125.2	10	2.0	4.3
Furalaxyl	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	12.35	302.13868	Confirmed	3.40x10 <sup>-2</sup>	4.61x10 <sup>-2</sup>	0.9927	128.6	133.0	132.8	5	10.5	6.8
Furathiocarb	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S	20.00	383.16352	Confirmed	2.87x10 <sup>-2</sup>	3.64x10 <sup>-2</sup>	0.9914	71.7 *	91.6	87.4	10	5.2	7.1
Furmecycloz	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	16.72	252.15942	Confirmed	3.72x10 <sup>-2</sup>	5.91x10 <sup>-2</sup>	0.9889	107.9 *	128.2	128.8	10	5.7	4.7
Halosulfuron-methyl	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S	14.83	435.04842	Quan only	1.58x10 <sup>-3</sup>	3.95x10 <sup>-3</sup>	0.9897	47.9	109.8	121.3	5	18.3	8.9
Haloxypop	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	16.11	362.04015	Confirmed	-1.45x10 <sup>-3</sup>	3.63x10 <sup>-3</sup>	0.9895	65.2	127.8	132.1	5	15.1	10.9
Haloxypop-2-Ethoxyethyl	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>5</sub>	19.86	434.09766	Confirmed	1.08x10 <sup>-2</sup>	1.88x10 <sup>-2</sup>	0.9871	63.8	76.7	76.8	5	10.9	8.6
Haloxypop-methyl	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	18.83	376.05580	Confirmed	5.15x10 <sup>-2</sup>	4.54x10 <sup>-2</sup>	0.9927	85.5 *	108.9	107.5	10	4.9	4.3
Heptenophos	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> ClO <sub>4</sub> P	10.79	251.02345	Confirmed	5.26x10 <sup>-3</sup>	1.68x10 <sup>-2</sup>	0.9861	83.1	102.5	107.7	5	3.8	3.8
Hexaconazole	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O	17.61	314.08214	Confirmed	2.36x10 <sup>-3</sup>	1.04x10 <sup>-2</sup>	0.9914	86.3	109.0	110.3	5	8.9	6.1
Hexazinon	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	8.28	253.16590	Confirmed	1.66x10 <sup>-2</sup>	4.15x10 <sup>-2</sup>	0.9881	46.2 *	70.8	74.2	10	5.2	4.0
Hexythiazox	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	20.98	353.10850	Confirmed	-2.87x10 <sup>-3</sup>	6.74x10 <sup>-3</sup>	0.9874	36.2	59.8	62.1	5	20.5	10.1
Imazalil	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	9.52	297.05560	Confirmed	2.75x10 <sup>-2</sup>	2.52x10 <sup>-2</sup>	0.9883	108.2	123.2	116.6	5	4.6	3.7
Imazethapyr	C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	6.65	290.14992	Confirmed	-4.61x10 <sup>-2</sup>	2.35x10 <sup>-2</sup>	0.9889	46.8	27.8	21.8	5	2.2	3.7
Imazosulfuron	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S	14.22	413.04294	Confirmed	-4.63x10 <sup>-4</sup>	4.28x10 <sup>-3</sup>	0.9879	49.4	103.4	113.4	5	6.7	9.8
Imibenconazole	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>4</sub> S	20.78	410.99993	Confirmed	-2.24x10 <sup>-4</sup>	3.47x10 <sup>-3</sup>	0.9890	41.1	76.9	84.6	5	31.5	14.3
Imiprothrin	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	14.53	319.16523	Check ID	5.27x10 <sup>-3</sup>	9.19x10 <sup>-3</sup>	0.9906	74.2	103.1	107.0	5	10.6	5.1
Inabenfide	C <sub>19</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	12.81	339.08948	Check ID	-8.93x10 <sup>-3</sup>	5.39x10 <sup>-3</sup>	0.9915	**	68.4	83.7	10	10.1	14.8

Compuesto (Nomenclatura siempre en inglés)	Identificación cromatográfica y de espectrometría §				Regresión lineal ponderada ‡ (WLS, 1/x, Niveles=6, n=3)			Recuperación a cada nivel 1 (n=4, días=3)			Precisión mostrada solo al LOQ †		
	Formula	Tiemp Ret. (min)	Señal de Cuantific. (m/z)	Fragmento de MS2	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	N1: 5 µg/kg (%)	N2: 10 µg/kg (%)	N3: 20 µg/kg (%)	LOQ (µg/kg)	RSD <sub>f</sub> (%)	RSD <sub>ri</sub> (%)
Indanofan	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> ClO <sub>3</sub>	15.17	341.09390	Check ID	-3.88x10 <sup>-3</sup>	1.88x10 <sup>-3</sup>	0.9890	**	33.5	64.2	10	20.8	9.4
Indaziflam	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>5</sub>	14.81	302.17755	Confirmed	5.63x10 <sup>-2</sup>	4.00x10 <sup>-2</sup>	0.9882	108.3	119.8	118.3	5	8.4	5.5
Ipconazole	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> ClN <sub>3</sub> O	19.46	334.16807	Confirmed	8.99x10 <sup>-3</sup>	1.68x10 <sup>-2</sup>	0.9924	78.4	94.2	91.1	5	3.6	14.9
Iprovalicarb	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	14.34	321.21727	Check ID	-3.99x10 <sup>-2</sup>	3.74x10 <sup>-2</sup>	0.9848	91.3	92.2	120.6	5	3.9	4.8
Isazophos	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS	14.07	314.04895	Confirmed	2.32x10 <sup>-2</sup>	4.36x10 <sup>-2</sup>	0.9889	124.6	131.0	131.2	5	7.2	5.1
Isocarbophos	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>4</sub> PS	16.46	230.98754	Quan only	7.29x10 <sup>-3</sup>	2.25x10 <sup>-2</sup>	0.9876	109.2	138.6	139.5	5	14.1	16.7
Isofenphos	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>4</sub> PS	18.02	346.12364	Confirmed	-2.15x10 <sup>-4</sup>	5.79x10 <sup>-3</sup>	0.9934	68.0	104.3	108.6	5	15.7	8.0
Isopropalin	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	22.02	310.17613	Confirmed	-3.22x10 <sup>-3</sup>	1.29x10 <sup>-2</sup>	0.9904	88.1	101.4	94.5	5	5.3	12.3
Isoprothiolane	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	13.73	291.07193	Confirmed	4.78x10 <sup>-2</sup>	4.40x10 <sup>-2</sup>	0.9893	112.8 *	129.7	128.2	10	2.6	3.8
Isoproturon	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O	10.42	207.14919	Check ID	6.53x10 <sup>-2</sup>	6.47x10 <sup>-2</sup>	0.9900	127.4 *	131.4	126.5	10	1.9	4.0
Isouron	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	8.22	212.13935	Confirmed	2.08x10 <sup>-2</sup>	5.32x10 <sup>-2</sup>	0.9889	100.7	103.0	110.6	5	5.4	7.6
Isoxaben	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	13.49	333.18088	Confirmed	1.52x10 <sup>-2</sup>	2.93x10 <sup>-2</sup>	0.9859	107.2 *	122.7	118.8	10	2.8	3.6
Isoxadifen-ethyl	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub>	16.48	296.12812	Confirmed	4.97x10 <sup>-2</sup>	3.00x10 <sup>-2</sup>	0.9914	116.0	107.2	99.5	5	10.4	5.9
Isoxathion	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>4</sub> PS	18.43	314.06104	Confirmed	6.01x10 <sup>-2</sup>	5.49x10 <sup>-2</sup>	0.9922	85.4 *	107.0	106.5	10	3.1	4.0
Karbutilate	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	7.60	280.16557	Confirmed	2.50x10 <sup>-2</sup>	2.96x10 <sup>-2</sup>	0.9857	125.2	132.9	131.3	5	3.5	4.1
Kresoxim Methyl	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	16.38	314.13868	Confirmed	2.69x10 <sup>-2</sup>	2.33x10 <sup>-2</sup>	0.9924	130.5 *	143.1	135.8	10	4.1	4.9
Linuron	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	12.73	249.01921	Confirmed	-5.42x10 <sup>-3</sup>	1.13x10 <sup>-2</sup>	0.9884	81.2	103.5	112.9	5	11.5	15.5
Malathion	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> PS <sub>2</sub>	13.47	331.04334	Confirmed	1.32x10 <sup>-2</sup>	2.57x10 <sup>-2</sup>	0.9888	112.2	120.8	120.6	5	5.1	6.8
Malathion-oxon	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>7</sub> PS	7.75	315.06619	Confirmed	2.39x10 <sup>-2</sup>	3.32x10 <sup>-2</sup>	0.9891	108.4 *	120.1	117.9	10	4.1	4.1
Mandipropamid	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>4</sub>	13.73	412.13101	Confirmed	7.36x10 <sup>-3</sup>	1.04x10 <sup>-2</sup>	0.9838	95.3	117.2	122.0	5	9.9	7.3
Mecarbam	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>5</sub> PS <sub>2</sub>	14.79	330.05933	Check ID	2.68x10 <sup>-2</sup>	2.99x10 <sup>-2</sup>	0.9902	73.4	91.9	93.7	5	8.2	6.1
Mefenacet	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	14.62	299.08487	Confirmed	2.91x10 <sup>-2</sup>	4.77x10 <sup>-2</sup>	0.9916	88.6 *	117.8	121.7	10	8.9	7.7
Mefenpyr-diethyl	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	17.47	373.07164	Confirmed	1.67x10 <sup>-2</sup>	2.00x10 <sup>-2</sup>	0.9919	78.5	99.2	97.4	5	10.4	6.4
Mefluidide	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	7.73	311.06717	Confirmed	-1.38x10 <sup>-5</sup>	7.82x10 <sup>-3</sup>	0.9887	53.4 *	93.1	103.3	10	11.6	7.9
Mepanipyrim	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub>	15.43	224.11822	Quan only	-1.98x10 <sup>-2</sup>	6.12x10 <sup>-2</sup>	0.9913	83.9	99.1	103.0	5	1.6	7.1

Compuesto (Nomenclatura siempre en inglés)	Identificación cromatográfica y de espectrometría §				Regresión lineal ponderada ¶ (WLS, 1/x, Niveles=6, n=3)			Recuperación a cada nivel 1 (n=4, días=3)			Precisión mostrada solo al LOQ †		
	Formula	Tiemp Ret. (min)	Señal de Cuantific. (m/z)	Fragmento de MS2	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	N1: 5 µg/kg (%)	N2: 10 µg/kg (%)	N3: 20 µg/kg (%)	LOQ (µg/kg)	RSD <sub>f</sub> (%)	RSD <sub>Ri</sub> (%)
Mephosfolan	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	7.48	270.03820	Confirmed	3.56x10 <sup>-2</sup>	3.71x10 <sup>-2</sup>	0.9880	82.5 *	94.3	95.9	10	6.9	4.8
Mepronil	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>2</sub>	13.47	270.14886	Confirmed	3.55x10 <sup>-2</sup>	3.94x10 <sup>-2</sup>	0.9880	121.2	117.8	118.3	5	8.8	7.8
Metalaxyl	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	10.13	280.15433	Confirmed	5.07x10 <sup>-2</sup>	1.05x10 <sup>-1</sup>	0.9875	92.8 *	126.7	131.2	10	8.5	6.0
Metazachlor	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> O	10.10	278.10547	Check ID	-3.81x10 <sup>-2</sup>	3.21x10 <sup>-2</sup>	0.9846	41.0	61.1	98.3	5	8.6	5.8
Metconazole	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O	17.93	320.15242	Check ID	2.44x10 <sup>-3</sup>	1.52x10 <sup>-2</sup>	0.9916	52.1	85.0	87.1	5	10.8	11.9
Methabenzthiazuron	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> OS	10.86	222.06956	Confirmed	-6.69x10 <sup>-2</sup>	3.12x10 <sup>-2</sup>	0.9804	92.9	91.8	49.1	5	4.9	4.4
Methacrifos	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub> PS	11.15	241.02941	Confirmed	-1.56x10 <sup>-3</sup>	8.91x10 <sup>-3</sup>	0.9912	80.5	109.6	117.8	5	7.5	10.7
Methidathion	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>3</sub>	10.95	302.96829	Confirmed	7.06x10 <sup>-3</sup>	1.70x10 <sup>-2</sup>	0.9876	91.0	103.4	104.8	5	7.0	5.7
Methomyl	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	4.45	106.03211	Quan only	-3.98x10 <sup>-2</sup>	1.63x10 <sup>-2</sup>	0.9449	52.4	31.1	28.5	5	1.0	6.2
Methoprotryne	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> OS	10.29	272.15396	Confirmed	5.98x10 <sup>-2</sup>	6.34x10 <sup>-2</sup>	0.9889	125.3 *	141.3	136.3	10	2.4	4.1
Methoxyfenozide	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	14.04	369.21727	Confirmed	8.98x10 <sup>-3</sup>	1.46x10 <sup>-2</sup>	0.9869	131.6	131.6	127.6	5	6.9	4.8
Methyl Paraoxon	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>6</sub> P	10.91	248.03185	Check ID	-1.71x10 <sup>-2</sup>	2.11x10 <sup>-2</sup>	0.9909	38.0	41.5	64.3	5	19.0	10.6
Metobromuron	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9.94	259.00767	Confirmed	1.96x10 <sup>-3</sup>	1.50x10 <sup>-2</sup>	0.9871	73.0	90.6	98.0	5	5.8	10.0
Metolachlor	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>2</sub>	15.11	284.14118	Confirmed	5.77x10 <sup>-2</sup>	9.05x10 <sup>-2</sup>	0.9909	100.8	114.1	116.0	5	4.6	4.3
Metominostrobin, E-	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	10.77	285.12337	Confirmed	3.08x10 <sup>-2</sup>	3.72x10 <sup>-2</sup>	0.9888	123.5 *	134.0	128.3	10	2.2	3.7
Metominostrobin, Z-	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	8.80	285.12337	Check ID	1.61x10 <sup>-2</sup>	2.86x10 <sup>-2</sup>	0.9870	**	115.2	114.4	10	2.3	4.4
Metosulam	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S	8.48	418.01381	Quan only	-1.65x10 <sup>-3</sup>	4.71x10 <sup>-3</sup>	0.9867	42.9	90.0	97.9	5	24.5	19.9
Metoxuron	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6.63	229.07383	Confirmed	2.42x10 <sup>-3</sup>	2.03x10 <sup>-2</sup>	0.9899	56.1 *	86.2	93.9	10	7.5	5.2
Metrafenone	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> BrO <sub>5</sub>	18.44	409.06451	Confirmed	8.55x10 <sup>-3</sup>	1.53x10 <sup>-2</sup>	0.9927	74.0	90.7	88.1	5	6.1	8.1
Metribuzin	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> OS	7.33	215.09611	Confirmed	-3.82x10 <sup>-2</sup>	2.00x10 <sup>-2</sup>	0.9875	**	47.8	83.6	10	17.8	17.3
Metsulfuron-methyl	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S	8.05	382.08158	Quan only	-1.42x10 <sup>-3</sup>	8.04x10 <sup>-3</sup>	0.9813	41.1	79.1	90.7	5	22.8	12.5
Mevinphos	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub> P	5.24	225.05225	Check ID	-4.48x10 <sup>-2</sup>	2.56x10 <sup>-2</sup>	0.9898	**	32.3	42.2	10	12.3	8.3
Molinate	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NOS	13.65	188.11036	Quan only	-1.23x10 <sup>-2</sup>	3.08x10 <sup>-2</sup>	0.9897	43.2	85.0	95.2	5	11.5	13.5
Monolinuron	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9.09	215.05818	Confirmed	5.49x10 <sup>-3</sup>	2.42x10 <sup>-2</sup>	0.9883	77.7 *	97.6	97.9	10	3.7	3.6
Monuron	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O	7.72	199.06327	Check ID	-1.73x10 <sup>-2</sup>	2.64x10 <sup>-2</sup>	0.9886	**	65.3	84.1	10	7.5	17.8

Compuesto (Nomenclatura siempre en inglés)	Identificación cromatográfica y de espectrometría §				Regresión lineal ponderada ¶ (WLS, 1/x, Niveles=6, n=3)			Recuperación a cada nivel 1 (n=4, días=3)			Precisión mostrada solo al LOQ †		
	Formula	Tiemp Ret. (min)	Señal de Cuantific. (m/z)	Fragmento de MS2	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	N1: 5 µg/kg (%)	N2: 10 µg/kg (%)	N3: 20 µg/kg (%)	LOQ (µg/kg)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>ri</sub> (%)
Myclobutanil	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub>	14.20	289.12145	Confirmed	7.03x10 <sup>-3</sup>	1.27x10 <sup>-2</sup>	0.9921	104.9	123.2	121.3	5	11.0	7.0
Naphthalophos (naftalofos)	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>6</sub> P	14.19	350.07880	Confirmed	3.14x10 <sup>-2</sup>	2.99x10 <sup>-2</sup>	0.9886	46.6 *	69.3	72.0	10	1.6	4.7
Napropamide	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub>	15.39	272.16451	Confirmed	5.54x10 <sup>-2</sup>	6.76x10 <sup>-2</sup>	0.9910	107.9 *	128.2	124.5	10	0.5	3.9
Naptalam	C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>	7.78	292.09682	Confirmed	-7.69x10 <sup>-3</sup>	2.99x10 <sup>-3</sup>	0.9871	**	37.0	48.9	10	5.1	4.7
Neburon	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	16.36	275.07125	Check ID	3.67x10 <sup>-2</sup>	2.56x10 <sup>-2</sup>	0.9920	116.0	126.8	125.3	5	0.6	3.7
Nicosulfuron	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S	9.58	411.10813	Quan only	1.46x10 <sup>-2</sup>	1.27x10 <sup>-2</sup>	0.9861	147.6	145.9	138.8	5	1.9	5.2
Nitenpyram	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	4.28	271.09563	Confirmed	-1.11x10 <sup>-2</sup>	7.29x10 <sup>-3</sup>	0.9842	45.2	21.5	10.4	5	6.3	5.8
Norflurazon	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O	10.98	304.04590	Confirmed	1.11x10 <sup>-2</sup>	2.20x10 <sup>-2</sup>	0.9880	82.1 *	98.7	99.9	10	4.0	3.7
Norflurazon-desmethyl	C <sub>11</sub> H <sub>7</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O	9.35	290.03025	Confirmed	3.54x10 <sup>-3</sup>	1.40x10 <sup>-2</sup>	0.9884	83.2	95.9	97.6	5	6.6	7.8
Nuarimol	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> ClFN <sub>2</sub> O	12.51	315.06950	Confirmed	1.81x10 <sup>-3</sup>	7.17x10 <sup>-3</sup>	0.9896	119.5	126.8	124.1	5	8.9	5.3
Ochrotaxina A ‡	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>6</sub>	14.50	257.02069	Confirmed	1.04x10 <sup>-2</sup>	4.02x10 <sup>-1</sup>	0.9918	69.4	74.0	75.7	5	12.0	4.3
Ofurace	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> ClNO <sub>3</sub>	7.71	282.08915	Confirmed	-8.71x10 <sup>-3</sup>	1.34x10 <sup>-2</sup>	0.9849	57.3	85.6	97.5	5	11.1	7.5
Orbencarb	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> ClNOS	18.02	258.07139	Confirmed	-7.01x10 <sup>-2</sup>	4.89x10 <sup>-2</sup>	0.9571	59.9	72.4	72.9	5	5.9	4.8
Oxadiargyl	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	17.83	341.04542	Quan only	-1.33x10 <sup>-3</sup>	1.60x10 <sup>-3</sup>	0.9887	**	37.9	71.8	10	20.0	19.1
Oxadiazon	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	20.38	345.07672	Confirmed	-1.91x10 <sup>-3</sup>	2.43x10 <sup>-3</sup>	0.9899	**	32.5	43.7	10	29.2	15.6
Oxasulfuron	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S	7.57	407.10198	Quan only	-5.29x10 <sup>-3</sup>	5.16x10 <sup>-3</sup>	0.9867	34.8	73.4	83.7	5	18.1	6.9
Oxaziclomefone	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	19.91	376.08656	Confirmed	1.84x10 <sup>-2</sup>	2.16x10 <sup>-2</sup>	0.9898	41.1	71.1	71.1	5	4.7	17.8
Oxycarboxin	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> S	5.64	268.06381	Confirmed	-1.37x10 <sup>-2</sup>	1.02x10 <sup>-2</sup>	0.9796	65.2	58.9	44.6	5	32.8	14.4
Oxyfluorfen	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	16.11	362.04015	Quan only	-1.45x10 <sup>-3</sup>	3.63x10 <sup>-3</sup>	0.9895	65.2	127.8	132.1	5	15.1	10.9
Paclobutrazol	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>3</sub> O	13.26	294.13677	Check ID	-2.49x10 <sup>-3</sup>	1.85x10 <sup>-2</sup>	0.9897	49.1	98.5	111.4	5	13.0	13.8
Parathion-oxon	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>6</sub> P	9.84	276.06315	Confirmed	-2.85x10 <sup>-3</sup>	1.24x10 <sup>-2</sup>	0.9863	80.2	98.6	102.7	5	9.5	10.2
Penconazol	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	17.13	284.07158	Confirmed	1.35x10 <sup>-2</sup>	1.93x10 <sup>-2</sup>	0.9919	103.2	114.6	113.9	5	8.7	6.1
Pencycuron	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O	18.63	329.14152	Confirmed	2.02x10 <sup>-2</sup>	2.69x10 <sup>-2</sup>	0.9897	80.6	95.1	94.2	5	7.0	6.1
Pendimethalin	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	21.13	282.14483	Confirmed	-3.66x10 <sup>-3</sup>	1.29x10 <sup>-2</sup>	0.9885	72.7	83.6	83.4	5	6.7	6.7
Pentachlor	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> ClNO	16.01	240.11497	Quan only	1.99x10 <sup>-2</sup>	4.03x10 <sup>-2</sup>	0.9897	67.9	81.9	97.1	5	17.3	9.5

Compuesto (Nomenclatura siempre en inglés)	Identificación cromatográfica y de espectrometría §				Regresión lineal ponderada ¶ (WLS, 1/x, Niveles=6, n=3)			Recuperación a cada nivel 1 (n=4, días=3)			Precisión mostrada solo al LOQ †		
	Formula	Tiemp Ret. (min)	Señal de Cuantific. (m/z)	Fragmento de MS2	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	N1: 5 µg/kg (%)	N2: 10 µg/kg (%)	N3: 20 µg/kg (%)	LOQ (µg/kg)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>ri</sub> (%)
Penthiopyrad	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	17.05	360.13519	Confirmed	2.17x10 <sup>-2</sup>	3.37x10 <sup>-2</sup>	0.9889	93.4 *	114.8	113.5	10	3.2	4.8
Phenothrin	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	23.01	351.19547	Check ID	-5.94x10 <sup>-3</sup>	4.85x10 <sup>-3</sup>	0.8999	44.2	50.3	55.3	5	21.9	10.3
Phenthoate	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>	16.50	321.03786	Confirmed	2.28x10 <sup>-2</sup>	2.41x10 <sup>-2</sup>	0.9910	104.4	125.1	123.9	5	5.6	4.6
Phorate	C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub> PS <sub>3</sub>	17.73	261.02010	Check ID	-5.86x10 <sup>-3</sup>	2.78x10 <sup>-3</sup>	0.9782	59.6	92.4	85.6	5	7.7	6.7
Phorate oxon	C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	10.81	245.04295	Confirmed	1.93x10 <sup>-2</sup>	3.36x10 <sup>-2</sup>	0.9897	59.9 *	90.3	91.9	10	7.1	5.3
Phorate Sulfoxide	C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>3</sub>	9.41	277.01502	Confirmed	1.86x10 <sup>-2</sup>	3.61x10 <sup>-2</sup>	0.9903	101.8 *	121.7	119.4	10	2.4	3.7
Phorate-oxon Sulfone	C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> O <sub>5</sub> PS <sub>2</sub>	5.51	277.03278	Confirmed	-7.31x10 <sup>-3</sup>	2.24x10 <sup>-2</sup>	0.9876	60.8	62.2	78.8	5	12.5	17.3
Phorate-sulfone	C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>3</sub>	9.58	293.00993	Confirmed	5.02x10 <sup>-3</sup>	1.42x10 <sup>-2</sup>	0.9898	92.5	110.5	113.5	5	6.2	14.0
Phosalone	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> ClNO <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>	18.24	367.99414	Confirmed	3.75x10 <sup>-3</sup>	8.94x10 <sup>-3</sup>	0.9913	65.7	89.5	92.1	5	6.7	7.6
Phosphamidon	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> ClNO <sub>5</sub> P	6.69	300.07621	Confirmed	-7.06x10 <sup>-2</sup>	1.79x10 <sup>-2</sup>	0.9209	**	54.6	37.7	10	5.2	7.7
Phoxim	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	16.65	299.06138	Confirmed	1.27x10 <sup>-2</sup>	3.80x10 <sup>-2</sup>	0.9915	86.1 *	105.3	105.9	10	5.0	5.2
Picolinafen	C <sub>19</sub> H <sub>12</sub> F <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20.93	377.09077	Confirmed	7.61x10 <sup>-3</sup>	1.65x10 <sup>-2</sup>	0.9881	72.8	81.7	84.4	5	3.9	4.0
Piperalin	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	9.48	330.10221	Quan only	3.28x10 <sup>-2</sup>	2.82x10 <sup>-2</sup>	0.9869	33.3	51.6	47.9	5	21.2	19.2
Piperonyl-butoxide	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	20.38	356.24315	Confirmed	3.34x10 <sup>-2</sup>	4.71x10 <sup>-2</sup>	0.9903	75.3 *	93.9	91.3	10	3.3	8.2
Piperophos	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> NO <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	19.03	354.13210	Confirmed	6.62x10 <sup>-2</sup>	4.99x10 <sup>-2</sup>	0.9935	142.3	152.9	143.9	5	3.8	4.4
Pirimicarb	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	6.49	239.15025	Confirmed	2.28x10 <sup>-2</sup>	5.05x10 <sup>-2</sup>	0.9903	92.4 *	111.2	113.6	10	3.2	4.0
Pirimiphos Methyl	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS	17.25	306.10358	Confirmed	-1.16x10 <sup>-2</sup>	4.69x10 <sup>-2</sup>	0.9888	60.2	95.3	93.9	5	18.0	16.7
Pirimiphos-ethyl	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS	19.98	334.13488	Confirmed	2.68x10 <sup>-2</sup>	5.23x10 <sup>-2</sup>	0.9894	55.6	80.3	80.8	5	10.9	11.2
Pirimiphos-methyl-n- desethyl	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS	10.13	278.07228	Confirmed	2.74x10 <sup>-2</sup>	4.11x10 <sup>-2</sup>	0.9868	106.2 *	122.0	121.9	10	3.0	4.5
Prallethrin	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	18.92	301.17982	Confirmed	3.86x10 <sup>-2</sup>	2.03x10 <sup>-2</sup>	0.9894	122.2	120.9	111.4	5	8.0	5.5
Pretilachlor	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> ClNO <sub>2</sub>	19.21	312.17248	Confirmed	-3.84x10 <sup>-2</sup>	4.51x10 <sup>-2</sup>	0.9907	87.8	102.5	106.3	5	3.0	4.7
Prochloraz	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	17.97	376.03809	Confirmed	9.93x10 <sup>-3</sup>	1.51x10 <sup>-2</sup>	0.9928	87.0	105.2	104.0	5	9.0	5.6
Profenofos	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> BrClO <sub>3</sub> PS	19.91	372.94242	Check ID	8.02x10 <sup>-3</sup>	7.97x10 <sup>-3</sup>	0.9918	**	44.3	54.9	10	17.3	18.6
Promecarb	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>	12.99	208.13321	Confirmed	4.37x10 <sup>-2</sup>	4.69x10 <sup>-2</sup>	0.9881	**	138.4	124.2	10	3.2	3.8
Prometon	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O	8.59	226.16624	Confirmed	2.08x10 <sup>-1</sup>	2.23x10 <sup>-1</sup>	0.9897	109.4 *	125.3	121.5	10	2.1	3.8

Compuesto (Nomenclatura siempre en inglés)	Identificación cromatográfica y de espectrometría §				Regresión lineal ponderada ¶ (WLS, 1/x, Niveles=6, n=3)			Recuperación a cada nivel 1 (n=4, días=3)			Precisión mostrada solo al LOQ †		
	Formula	Tiemp Ret. (min)	Señal de Cuantific. (m/z)	Fragmento de MS2	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	N1: 5 µg/kg (%)	N2: 10 µg/kg (%)	N3: 20 µg/kg (%)	LOQ (µg/kg)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>ri</sub> (%)
Prometryn	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> S	12.00	242.14339	Confirmed	3.21x10 <sup>-2</sup>	6.77x10 <sup>-2</sup>	0.9881	90.4	105.2	108.4	5	5.5	3.4
Propachlor	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> ClNO	10.04	212.08367	Confirmed	1.91x10 <sup>-2</sup>	5.19x10 <sup>-2</sup>	0.9887	90.4 *	105.3	107.4	10	1.0	3.5
Propaphos	C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> O <sub>4</sub> PS	17.13	305.09709	Confirmed	2.58x10 <sup>-2</sup>	2.86x10 <sup>-2</sup>	0.9789	106.8 *	120.1	116.7	10	7.0	8.2
Propargite	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> S	21.33	368.18901	Confirmed	1.84x10 <sup>-2</sup>	2.49x10 <sup>-2</sup>	0.9913	33.4 *	51.2	56.4	10	7.5	11.6
Propazine	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>5</sub>	11.98	146.02263	Confirmed	9.32x10 <sup>-3</sup>	1.14x10 <sup>-2</sup>	0.9889	105.8 *	117.4	113.4	10	2.9	4.8
Propetamphos	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>4</sub> PS	13.90	282.09234	Confirmed	4.74x10 <sup>-3</sup>	1.20x10 <sup>-2</sup>	0.9909	92.1	110.0	114.7	5	3.2	9.3
Propiconazol (mixture Of Isomers)	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	17.54	342.07706	Confirmed	-4.67x10 <sup>-3</sup>	1.16x10 <sup>-2</sup>	0.9068	57.4	72.1	90.2	5	8.5	7.2
Propisochlor	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>2</sub>	15.11	284.14118	Confirmed	5.77x10 <sup>-2</sup>	9.05x10 <sup>-2</sup>	0.9909	100.8	114.1	116.0	5	4.6	4.3
Propyzamide (pronamide)	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO	13.02	256.02905	Confirmed	-7.78x10 <sup>-3</sup>	7.65x10 <sup>-3</sup>	0.9877	76.5	84.0	97.1	5	7.8	12.5
Proquinazid	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> IN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	22.01	373.04075	Confirmed	2.38x10 <sup>-2</sup>	3.51x10 <sup>-2</sup>	0.9913	55.5	65.1	64.9	5	2.2	7.4
Prosulfocarb	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> NOS	19.44	252.14166	Quan only	2.69x10 <sup>-2</sup>	5.00x10 <sup>-2</sup>	0.9915	71.6 *	84.9	85.5	10	7.0	5.5
Prosulfuron	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S	12.88	420.09479	Confirmed	4.54x10 <sup>-3</sup>	7.86x10 <sup>-3</sup>	0.9890	99.7	124.5	125.0	5	6.3	7.5
Prothioconazole	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> OS	17.32	344.03856	Confirmed	-3.17x10 <sup>-3</sup>	1.26x10 <sup>-3</sup>	0.9864	**	37.5	62.2	10	6.1	7.7
Pyraclufos	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	18.39	361.05370	Confirmed	2.56x10 <sup>-2</sup>	2.19x10 <sup>-2</sup>	0.9902	82.0	98.2	97.6	5	7.7	7.0
Pyraclostrobin	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	18.32	388.10586	Confirmed	2.37x10 <sup>-2</sup>	3.65x10 <sup>-2</sup>	0.9918	107.9 *	121.3	116.4	10	3.8	5.0
Pyraflufen-ethyl	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	17.57	413.02772	Confirmed	1.00x10 <sup>-2</sup>	1.37x10 <sup>-2</sup>	0.9922	51.8 *	76.8	78.8	10	3.3	8.8
Pyrazolynate	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	18.92	439.02806	Quan only	6.50x10 <sup>-3</sup>	1.13x10 <sup>-2</sup>	0.9890	47.6	72.7	72.2	5	9.5	19.3
Pyrazophos	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> PS	18.39	374.09340	Confirmed	2.27x10 <sup>-2</sup>	2.06x10 <sup>-2</sup>	0.9921	87.8 *	111.4	110.2	10	3.1	4.7
Pyrazosulfuron-ethyl	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S	14.77	415.10304	Check ID	5.31x10 <sup>-3</sup>	9.87x10 <sup>-3</sup>	0.9902	110.8	133.9	137.1	5	10.4	6.0
Pyrazoxyfen	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	17.46	403.06107	Confirmed	7.63x10 <sup>-3</sup>	1.24x10 <sup>-2</sup>	0.9907	69.6	91.7	88.6	5	2.4	7.8
Pyributicarb	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	20.69	331.14748	Confirmed	2.98x10 <sup>-2</sup>	4.76x10 <sup>-2</sup>	0.9898	75.9 *	91.0	89.3	10	8.9	7.8
Pyridaben	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>2</sub> OS	22.36	365.14489	Confirmed	3.82x10 <sup>-2</sup>	3.31x10 <sup>-2</sup>	0.9774	99.8	102.3	103.4	5	8.8	6.9
Pyridafol	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> ClN <sub>2</sub> O	6.63	207.03197	Confirmed	4.80x10 <sup>-3</sup>	1.44x10 <sup>-2</sup>	0.9903	40.5 *	86.2	90.8	10	7.9	5.5
Pyridaphenthion	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> PS	14.48	341.07194	Confirmed	2.57x10 <sup>-2</sup>	2.55x10 <sup>-2</sup>	0.9895	100.2	113.8	115.8	5	3.3	4.1
Pyridate	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	23.00	379.12415	Confirmed	4.40x10 <sup>-3</sup>	1.69x10 <sup>-2</sup>	0.9928	33.2	40.6	45.7	5	14.0	7.9

Compuesto (Nomenclatura siempre en inglés)	Identificación cromatográfica y de espectrometría §				Regresión lineal ponderada ¶ (WLS, 1/x, Niveles=6, n=3)			Recuperación a cada nivel 1 (n=4, días=3)			Precisión mostrada solo al LOQ †		
	Formula	Tiemp Ret. (min)	Señal de Cuantific. (m/z)	Fragmento de MS2	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	N1: 5 µg/kg (%)	N2: 10 µg/kg (%)	N3: 20 µg/kg (%)	LOQ (µg/kg)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>ri</sub> (%)
Pyriphenox	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	13.96	295.03994	Confirmed	4.14x10 <sup>-3</sup>	1.43x10 <sup>-2</sup>	0.9884	82.1	99.0	102.0	5	2.3	7.4
Pyrimethanil	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub>	11.79	200.11822	Confirmed	3.15x10 <sup>-2</sup>	5.77x10 <sup>-2</sup>	0.9861	103.2	106.4	104.6	5	4.4	3.8
Pyriproxyfen	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	20.84	322.14377	Confirmed	4.56x10 <sup>-2</sup>	4.94x10 <sup>-2</sup>	0.9926	80.0 *	92.0	91.4	10	9.3	11.0
Pyroxsulam	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> F <sub>3</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S	7.90	435.06930	Quan only	2.98x10 <sup>-3</sup>	1.19x10 <sup>-2</sup>	0.9892	82.4	109.5	109.1	5	9.3	8.2
Quinalphos	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	16.65	299.06138	Confirmed	1.27x10 <sup>-2</sup>	3.80x10 <sup>-2</sup>	0.9915	86.1 *	105.3	105.9	10	5.0	5.2
Quinoxifen	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> FNO	21.40	308.00397	Check ID	7.62x10 <sup>-3</sup>	2.14x10 <sup>-2</sup>	0.9909	58.0	61.8	66.7	5	15.8	7.6
Quizalofop-ethyl	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	19.93	373.09496	Confirmed	4.05x10 <sup>-2</sup>	3.55x10 <sup>-2</sup>	0.9898	33.3 *	61.5	64.9	10	6.8	7.8
Resmethrin	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	22.65	339.19547	Confirmed	9.02x10 <sup>-3</sup>	3.40x10 <sup>-2</sup>	0.9817	65.1 *	74.8	74.4	10	10.5	8.0
Rimsulfuron	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	9.14	432.06422	Quan only	-3.72x10 <sup>-3</sup>	2.81x10 <sup>-3</sup>	0.9910	**	54.2	86.3	10	11.8	16.6
Rotenone	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	16.36	395.14891	Confirmed	1.29x10 <sup>-2</sup>	1.22x10 <sup>-2</sup>	0.9918	95.7 *	112.7	104.9	10	4.8	5.9
Sebutylazin	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>5</sub>	11.69	230.11670	Check ID	1.04x10 <sup>-1</sup>	6.12x10 <sup>-2</sup>	0.9898	**	139.6	122.7	10	0.8	4.3
Secbumeton	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O	8.59	226.16624	Quan only	2.08x10 <sup>-1</sup>	2.23x10 <sup>-1</sup>	0.9897	109.4 *	125.3	121.5	10	2.1	3.8
Sethoxydim	C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub> S	19.93	328.19409	Confirmed	2.58x10 <sup>-2</sup>	2.56x10 <sup>-2</sup>	0.9921	58.8	84.3	89.4	5	8.8	18.2
Siduron	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O	12.14	233.16484	Confirmed	2.35x10 <sup>-2</sup>	3.91x10 <sup>-2</sup>	0.9853	101.2 *	111.1	108.0	10	2.4	3.6
Silthiofam	C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> NOSSi	16.06	268.11859	Confirmed	1.76x10 <sup>-2</sup>	1.47x10 <sup>-2</sup>	0.9911	87.3 *	114.6	114.8	10	5.9	6.2
Simeconazole	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> OSi	14.92	294.14324	Check ID	-2.73x10 <sup>-4</sup>	2.07x10 <sup>-2</sup>	0.9925	82.4	106.8	112.5	5	9.3	7.5
Simetone	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O	5.77	198.13494	Confirmed	-1.81x10 <sup>-1</sup>	1.13x10 <sup>-1</sup>	0.9695	88.7	76.3	67.8	5	5.4	15.2
Simetryn	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> S	8.07	214.11209	Confirmed	3.55x10 <sup>-2</sup>	1.13x10 <sup>-1</sup>	0.9872	85.7	100.8	104.6	5	6.1	6.0
S-Metolachlor	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>2</sub>	15.11	284.14118	Confirmed	5.77x10 <sup>-2</sup>	9.05x10 <sup>-2</sup>	0.9909	100.8	114.1	116.0	5	4.6	4.3
Spirodiclofen	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	21.74	411.11244	Confirmed	6.09x10 <sup>-3</sup>	8.68x10 <sup>-3</sup>	0.9930	83.6	97.8	98.7	5	14.9	11.5
Spiromesifen	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	21.30	388.24824	Confirmed	2.09x10 <sup>-2</sup>	2.34x10 <sup>-2</sup>	0.9911	48.3 *	64.3	67.0	10	2.3	12.5
Spirotetramat	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>5</sub>	14.84	374.19620	Confirmed	3.43x10 <sup>-2</sup>	2.76x10 <sup>-2</sup>	0.9884	105.9 *	127.2	122.3	10	3.7	4.7
Spirotetramat-enol	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	9.16	302.17507	Confirmed	-2.18x10 <sup>-2</sup>	1.41x10 <sup>-2</sup>	0.9858	108.3	52.6	57.3	5	1.5	9.0
Spirotetramat-mono- hydroxy	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	7.15	304.19072	Confirmed	4.83x10 <sup>-3</sup>	1.37x10 <sup>-2</sup>	0.9868	63.4 *	71.9	69.3	10	11.1	7.8
Spiroxamine (mix Of Isomers)	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>2</sub>	13.16	298.27406	Confirmed	2.80x10 <sup>-2</sup>	6.21x10 <sup>-2</sup>	0.9905	95.9	94.7	86.2	5	8.4	7.3

Compuesto (Nomenclatura siempre en inglés)	Identificación cromatográfica y de espectrometría §				Regresión lineal ponderada ‡ (WLS, 1/x, Niveles=6, n=3)			Recuperación a cada nivel 1 (n=4, días=3)			Precisión mostrada solo al LOQ †		
	Formula	Tiemp Ret. (min)	Señal de Cuantific. (m/z)	Fragmento de MS2	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	N1: 5 µg/kg (%)	N2: 10 µg/kg (%)	N3: 20 µg/kg (%)	LOQ (µg/kg)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>Ri</sub> (%)
Sulfallate	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> CIN <sub>2</sub> S	16.55	224.03290	Quan only	-6.12x10 <sup>-3</sup>	1.16x10 <sup>-2</sup>	0.9906	106.6	123.2	125.2	5	14.3	7.6
Sulfometuron Methyl	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S	8.05	365.09142	Quan only	-3.57x10 <sup>-3</sup>	1.08x10 <sup>-2</sup>	0.9802	86.4	86.4	98.6	5	8.1	11.8
Sulprofos sulfoxide	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>3</sub>	15.36	339.03067	Confirmed	2.92x10 <sup>-2</sup>	2.75x10 <sup>-2</sup>	0.9916	94.9	109.0	109.0	5	5.1	5.4
Tebuconazole	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> CIN <sub>3</sub> O	16.98	308.15242	Confirmed	9.39x10 <sup>-3</sup>	1.59x10 <sup>-2</sup>	0.9903	112.3	126.9	121.9	5	5.8	6.3
Tebufenozide	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	16.30	353.22235	Check ID	8.34x10 <sup>-3</sup>	1.40x10 <sup>-2</sup>	0.9929	86.3	122.2	125.3	5	8.3	4.6
Tebufenpyrad	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> CIN <sub>3</sub> O	20.29	334.16807	Confirmed	1.40x10 <sup>-3</sup>	1.36x10 <sup>-2</sup>	0.9944	**	27.6	35.7	10	11.2	12.6
Tebupirimfos	C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	20.12	319.12398	Confirmed	1.25x10 <sup>-2</sup>	3.80x10 <sup>-2</sup>	0.9925	63.5	76.9	77.4	5	5.5	4.5
Tebutam	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> NO	15.06	234.18524	Quan only	5.77x10 <sup>-2</sup>	8.71x10 <sup>-2</sup>	0.9888	105.4 *	120.8	119.9	10	1.8	3.8
Tebuthiuron	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> OS	8.09	229.11176	Confirmed	-5.04x10 <sup>-3</sup>	3.15x10 <sup>-2</sup>	0.9890	34.8 *	69.6	81.7	10	6.3	6.1
Tepraloxidim	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> CINO <sub>4</sub>	14.85	342.14666	Confirmed	-7.78x10 <sup>-3</sup>	5.78x10 <sup>-3</sup>	0.9892	58.5	85.2	99.8	5	11.6	15.3
Terbucarb	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>2</sub>	18.77	278.21146	Confirmed	1.48x10 <sup>-2</sup>	2.49x10 <sup>-2</sup>	0.9926	41.3 *	94.4	107.2	10	6.9	10.0
Terbufos	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> O <sub>2</sub> PS <sub>3</sub>	20.11	289.05141	Check ID	9.08x10 <sup>-5</sup>	7.63x10 <sup>-3</sup>	0.9934	38.3	78.1	82.2	5	21.1	11.5
Terbufos-sulfon	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>3</sub>	11.86	321.04123	Confirmed	8.65x10 <sup>-3</sup>	1.65x10 <sup>-2</sup>	0.9884	122.5	130.6	129.1	5	3.6	4.5
Terbufos-sulfoxide	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>3</sub>	12.09	305.04632	Check ID	3.86x10 <sup>-2</sup>	3.45x10 <sup>-2</sup>	0.9895	131.6 *	144.9	139.7	10	3.4	4.7
Terbumeton	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O	8.59	226.16624	Confirmed	2.08x10 <sup>-1</sup>	2.23x10 <sup>-1</sup>	0.9897	109.4 *	125.3	121.5	10	2.1	3.8
Terbumeton-desethyl	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O	6.08	198.13494	Check ID	6.39x10 <sup>-2</sup>	4.77x10 <sup>-2</sup>	0.9876	88.4	93.7	92.6	5	1.9	3.4
Terbutryne	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> S	12.62	242.14339	Confirmed	2.92x10 <sup>-2</sup>	5.88x10 <sup>-2</sup>	0.9894	103.9	113.5	115.4	5	4.1	5.0
Tetrachlorvinphos (iso)	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>4</sub> O <sub>4</sub> P	16.28	364.90653	Confirmed	3.82x10 <sup>-3</sup>	6.07x10 <sup>-3</sup>	0.9924	72.6	103.7	110.4	5	16.5	11.2
Tetraconazole	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>4</sub> N <sub>3</sub> O	15.44	372.02881	Confirmed	8.56x10 <sup>-4</sup>	7.45x10 <sup>-3</sup>	0.9899	89.8	120.6	121.2	5	7.3	7.3
Tetraethyl Dithiopyrophosphate	C <sub>8</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub> P <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	16.64	323.03001	Confirmed	1.56x10 <sup>-2</sup>	4.50x10 <sup>-2</sup>	0.9889	107.1 *	126.2	123.2	10	5.5	5.0
Tetraethyl Pyrophosphate	C <sub>8</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub> P <sub>2</sub>	6.77	291.07570	Check ID	-6.05x10 <sup>-2</sup>	1.73x10 <sup>-2</sup>	0.9194	**	41.5	27.6	10	0.2	3.7
Tetramethrin	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub>	20.08	332.18563	Confirmed	1.45x10 <sup>-2</sup>	1.66x10 <sup>-2</sup>	0.9943	**	40.8	44.8	10	8.4	6.8
Thenylchlor	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> CINO <sub>2</sub> S	15.06	324.08195	Confirmed	1.93x10 <sup>-2</sup>	2.05x10 <sup>-2</sup>	0.9915	98.7	115.0	116.1	5	2.0	4.9
Thiabendazole	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> S	5.29	202.04334	Check ID	1.40x10 <sup>-3</sup>	2.26x10 <sup>-2</sup>	0.9860	**	29.4	71.6	10	34.3	19.1
Thiacloprid	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> CIN <sub>4</sub> S	6.20	253.03092	Check ID	2.05x10 <sup>-4</sup>	9.68x10 <sup>-3</sup>	0.9833	**	61.4	74.8	10	12.0	13.5

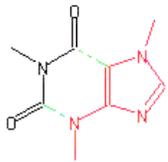
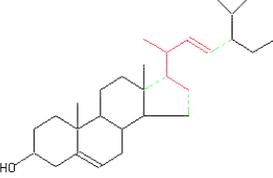
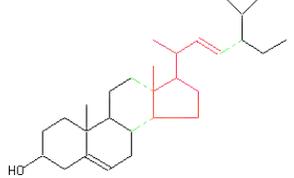
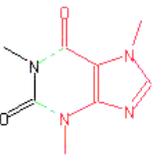
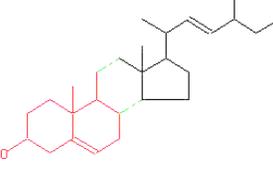
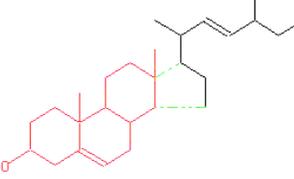
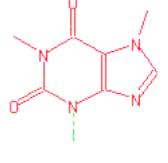
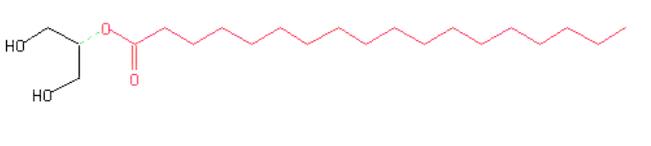
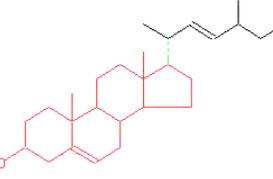
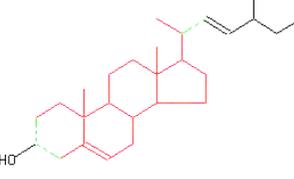
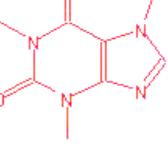
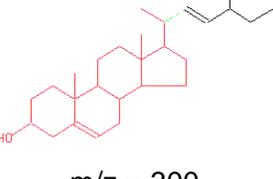
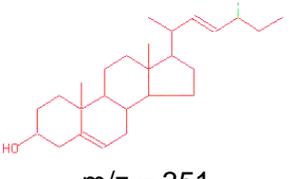
Compuesto (Nomenclatura siempre en inglés)	Identificación cromatográfica y de espectrometría §				Regresión lineal ponderada ¶ (WLS, 1/x, Niveles=6, n=3)			Recuperación a cada nivel 1 (n=4, días=3)			Precisión mostrada solo al LOQ †		
	Formula	Tiemp Ret. (min)	Señal de Cuantific. (m/z)	Fragmento de MS2	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	N1: 5 µg/kg (%)	N2: 10 µg/kg (%)	N3: 20 µg/kg (%)	LOQ (µg/kg)	RSD <sub>f</sub> (%)	RSD <sub>ri</sub> (%)
Thiazafluron	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> F <sub>3</sub> N <sub>4</sub> OS	7.90	241.03654	Confirmed	-1.75x10 <sup>-3</sup>	1.46x10 <sup>-2</sup>	0.9893	72.9	96.7	97.9	5	10.4	7.9
Thiazopyr	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> F <sub>5</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	16.88	397.10037	Confirmed	1.21x10 <sup>-2</sup>	3.51x10 <sup>-2</sup>	0.9914	90.0 *	110.7	110.1	10	3.5	3.9
Thidiazuron	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> OS	7.83	221.04916	Check ID	-9.62x10 <sup>-3</sup>	5.19x10 <sup>-3</sup>	0.9920	**	48.4	87.5	10	9.3	10.5
Thifensulfuron-methyl	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	7.63	388.03800	Quan only	-2.01x10 <sup>-3</sup>	5.89x10 <sup>-3</sup>	0.9856	33.6	78.5	79.7	5	8.7	7.5
Thiobencarb	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> CINOS	17.92	258.07139	Check ID	-7.17x10 <sup>-2</sup>	4.92x10 <sup>-2</sup>	0.9559	60.0	72.3	72.9	5	5.9	4.8
Thiodicarb	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sub>3</sub>	10.07	355.05629	Quan only	1.25x10 <sup>-2</sup>	1.90x10 <sup>-2</sup>	0.9849	57.7 *	84.2	85.3	10	3.2	4.5
Thionazine (zinophos)	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	10.18	249.04573	Confirmed	-1.53x10 <sup>-3</sup>	2.37x10 <sup>-2</sup>	0.9893	99.7	111.2	113.7	5	3.1	4.7
Thiophanate	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	10.54	371.08422	Confirmed	-6.03x10 <sup>-3</sup>	8.90x10 <sup>-3</sup>	0.9895	**	25.5	35.5	10	3.4	15.9
Thiophanate-ethyl	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	10.54	371.08422	Confirmed	-6.03x10 <sup>-3</sup>	8.90x10 <sup>-3</sup>	0.9895	**	25.5	35.5	10	3.4	15.9
Thiophanate-methyl	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	7.42	343.05292	Quan only	-4.88x10 <sup>-3</sup>	6.90x10 <sup>-3</sup>	0.9874	**	14.5	23.9	10	18.5	10.3
Tralkoxydim	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>	20.77	330.20637	Confirmed	2.40x10 <sup>-2</sup>	3.02x10 <sup>-2</sup>	0.9914	129.0	126.3	120.4	5	13.2	7.7
Triadimefon	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> CIN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	13.80	294.10038	Check ID	-4.07x10 <sup>-3</sup>	2.08x10 <sup>-2</sup>	0.9927	57.2 *	100.1	115.2	10	8.7	5.5
Triasulfuron	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> CIN <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S	7.56	402.06334	Quan only	-1.74x10 <sup>-3</sup>	5.63x10 <sup>-3</sup>	0.9868	56.8	97.7	106.5	5	17.5	16.5
Triazamate	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	14.29	315.14854	Check ID	5.71x10 <sup>-2</sup>	5.20x10 <sup>-2</sup>	0.9882	64.1 *	95.0	98.2	10	4.6	5.3
Triaziflam	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> FN <sub>5</sub> O	16.46	334.20377	Confirmed	3.07x10 <sup>-2</sup>	3.98x10 <sup>-2</sup>	0.9890	139.7 *	157.8	152.6	10	1.7	5.1
Triazophos	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS	14.81	314.07228	Confirmed	4.76x10 <sup>-2</sup>	4.23x10 <sup>-2</sup>	0.9896	107.2 *	125.3	125.3	10	1.5	4.3
Triazoxide	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> CIN <sub>5</sub> O	10.94	248.03336	Check ID	6.21x10 <sup>-3</sup>	2.17x10 <sup>-2</sup>	0.9863	65.6	83.9	85.2	5	4.9	5.3
Tribenuron-methyl	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S	10.55	396.09723	Quan only	-2.81x10 <sup>-3</sup>	4.91x10 <sup>-3</sup>	0.9917	60.4	111.5	115.9	5	11.3	12.4
Tribufos (def)	C <sub>12</sub> H <sub>27</sub> OPS <sub>3</sub>	22.19	315.10344	Confirmed	6.47x10 <sup>-2</sup>	5.89x10 <sup>-2</sup>	0.9885	81.8 *	92.3	90.8	10	9.8	7.4
Tricyclazole	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> S	7.08	190.04334	Check ID	5.99x10 <sup>-3</sup>	3.35x10 <sup>-2</sup>	0.9875	35.2	51.7	55.8	5	8.9	7.6
Trifloxystrobin	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	19.28	409.13697	Confirmed	2.16x10 <sup>-2</sup>	3.38x10 <sup>-2</sup>	0.9918	93.3 *	106.3	101.8	10	1.8	4.1
Triflumizole	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O	19.60	346.09285	Check ID	1.82x10 <sup>-2</sup>	3.67x10 <sup>-2</sup>	0.9924	100.7	108.5	103.9	5	4.7	4.1
Triflumuron	C <sub>15</sub> H <sub>0</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	18.38	359.04048	Check ID	1.07x10 <sup>-3</sup>	3.66x10 <sup>-3</sup>	0.9902	40.6 *	91.7	101.1	10	5.8	7.4
Tris(2-chloroethyl) Phosphate	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	7.72	284.96115	Confirmed	-4.24x10 <sup>-4</sup>	7.98x10 <sup>-3</sup>	0.9890	51.2	92.3	97.9	5	15.1	9.4
Tris (o-cresyl)phosphate	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>4</sub> P	21.13	369.12502	Confirmed	1.56x10 <sup>-2</sup>	2.13x10 <sup>-2</sup>	0.9884	49.0 *	67.9	69.4	10	4.2	16.4

Compuesto (Nomenclatura siempre en inglés)	Identificación cromatográfica y de espectrometría §				Regresión lineal ponderada ¶ (WLS, 1/x, Niveles=6, n=3)			Recuperación a cada nivel 1 (n=4, días=3)			Precisión mostrada solo al LOQ †		
	Formula	Tiemp Ret. (min)	Señal de Cuantific. (m/z)	Fragmento de MS2	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	N1: 5 µg/kg (%)	N2: 10 µg/kg (%)	N3: 20 µg/kg (%)	LOQ (µg/kg)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>Ri</sub> (%)
Triticonazole	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>5</sub> O	14.92	318.13677	Check ID	1.26x10 <sup>-2</sup>	1.26x10 <sup>-2</sup>	0.9909	77.1 *	112.4	113.2	10	4.7	6.3
Uniconazole	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O	15.82	292.12112	Check ID	4.42x10 <sup>-3</sup>	1.27x10 <sup>-2</sup>	0.9917	85.3	107.5	118.3	5	3.9	12.1
Zoxamide	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	17.03	336.03194	Confirmed	8.91x10 <sup>-3</sup>	1.28x10 <sup>-2</sup>	0.9898	68.5	95.4	94.9	5	12.1	7.9

**Tabla A6:** Programa de monitoreo dinámico de reacción múltiple (dMRM) para análisis de HAPs en GC-MS/MS

Compuesto	Precursor	Producto	Rt (min)	Dwell (ms)	CE (V)
Naphtalene	128	127	3,4	15,2	20
Naphtalene	128	102	3,4	15,2	22
Naphtalene-d <sub>8</sub>	136	136	3,4	15,2	5
Naphtalene-d <sub>8</sub>	136	108	3,4	15,2	30
Naphtalene-d <sub>8</sub>	136	84	3,4	15,2	30
Acenaphthene-d <sub>10</sub>	164	162,2	5,02	10	20
Acenaphthene-d <sub>10</sub>	164	160	5,02	10	45
Acenaphthene-d <sub>10</sub>	162	160,2	5,02	10	25
Acenaphthene	153,7	152,1	5,05	8,7	40
Acenaphthene	152,7	151,2	5,05	8,7	40
Fluorene	166	165	5,63	7,8	30
Fluorene	166	163	5,63	7,8	34
Fluorene-d <sub>10</sub>	176	176	5,66	7,3	5
Fluorene-d <sub>10</sub>	174	170	5,66	7,3	40
Fluorene-d <sub>10</sub>	174	122	5,66	7,3	35
Phenanthrene-d <sub>10</sub>	187,9	184	7,02	7,2	40
Phenanthrene-d <sub>10</sub>	187,9	160,1	7,02	7,2	30
Anthracene-d <sub>10</sub>	188	184	7,02	7,2	35
Anthracene-d <sub>10</sub>	188	158	7,02	7,2	45
Anthracene	178	176	7,13	7,7	35
Anthracene	178	152	7,13	7,7	30
Phenanthrene	177,7	176,1	7,13	7,7	35
Phenanthrene	177,7	152	7,13	7,7	25
Fluoranthene	202	201	9,24	9,3	50
Fluoranthene	202	200	9,24	9,3	50
Fluoranthene-d <sub>10</sub>	212	212	9,24	9,3	5
Fluoranthene-d <sub>10</sub>	212	208	9,24	9,3	45
Fluoranthene-d <sub>10</sub>	212	160	9,24	9,3	45
Pyrene-d <sub>10</sub>	212	212	9,67	9,7	5
Pyrene	202	201	9,7	10,3	30
Pyrene	202	200	9,7	10,3	50
Benz(a)anthracene	228	226	12,38	10,6	38
Benz(a)anthracene	228	224	12,38	10,6	38
Crysene	227,7	226,1	12,38	10,6	40
Crysene	227,7	200,1	12,38	10,6	60
Crysene	225,6	224,1	12,38	10,6	40
Benz(a)anthracene-d <sub>12</sub>	240	240	12,41	10,4	5
Benz(a)anthracene-d <sub>12</sub>	236	232	12,41	10,4	45
Crysene-d <sub>12</sub>	239,8	236,1	12,41	10,4	45
Crysene-d <sub>12</sub>	239,8	212,1	12,41	10,4	35
Crysene-d <sub>12</sub>	235,8	231,9	12,41	10,4	50
Benzo[a]pyrene	252	250	14,74	12,9	60
Benzo[a]pyrene	251	249	14,74	12,9	60
Benzo[a]pyrene-d <sub>12</sub>	263,8	260	14,74	12,9	45
Benzo[a]pyrene-d <sub>12</sub>	263,8	232	14,74	12,9	60
Benzo(b)fluoranthene-d <sub>12</sub>	264	264	15,33	14,7	5
Benzo(b)fluoranthene-d <sub>12</sub>	260	256	15,33	14,7	45
Benzo(b)fluoranthene	252	250	15,37	18,1	42
Benzo(b)fluoranthene	250	248	15,37	18,1	40
Benzo[g,h,i]perylene-d <sub>12</sub>	288	288	17,86	28,4	5
Benzo[g,h,i]perylene	276	274	17,89	41,4	45
Benzo[g,h,i]perylene	274	272	17,89	41,4	45
Benzo[g,h,i]perylene-d <sub>12</sub>	288	288	17,86	28,4	5
Benzo[g,h,i]perylene	276	274	17,89	41,4	45
Benzo[g,h,i]perylene	274	272	17,89	41,4	45

**Tabla A7:** Fragmentos (m/z) característicos (en rojo) de los componentes endógenos del extracto de café en modo FS.

Cafeína @ 7.44 min	Ácido hexadecanoico (C16:0) @ 12.77 min y octadecanoico (C18:0) @ 14.29 min. Estructura del monoglicérido, el precursor X- Mono-, di-, triglicérido no está especificado	Estigmasterol @ 18.0 – 18.5 min o posibles fitosteroles relacionados que compartan los mismos fragmentos	
 m/z = 109	 m/z = 239	 m/z = 81	 m/z = 135
 m/z = 136	 m/z = 257	 m/z = 159	 m/z = 213
 m/z = 165	 m/z = 267	 m/z = 255	 m/z = 271
 m/z = 194	 m/z = 284	 m/z = 300	 m/z = 351



**Tabla A8:** Salida en R para la comparación de la extracción AIO vs. AcOEt (GC-MS/MS).

```

> # Fit MANOVA model for the group of 4 PAHS previously assessed
> manova_model <- manova(cbind(Acenaphthene, Phenanthrene, Crysene,
Benzo.a.pyrene) ~ Extraction, data = data)
>
> # Summary of MANOVA
> summary(manova_model, test = "Pillai")
      Df Pillai approx F num Df den Df Pr(>F)
Extraction 1 0.99953  536.4      4      1 0.03237 *
Residuals  4
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
> # Perform multiple comparisons (MANOVA significant)
> # Get ANOVA tables for individual response variables
> summary.aov(manova_model)
Response Acenaphthene :
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Extraction 1  2.4067  2.4067  0.5721 0.4915
Residuals  4 16.8267  4.2067

Response Phenanthrene :
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Extraction 1  0.482  0.4817  0.0293 0.8725
Residuals  4 65.827 16.4567

Response Crysene :
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Extraction 1  3.84  3.840  0.1596  0.71
Residuals  4 96.26 24.065

Response Benzo.a.pyrene :
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Extraction 1 154.03 154.03  1.4269 0.2983
Residuals  4 431.77 107.94
#####
>
> # Fit MANOVA model for group of 4 PAHS assessed due to major differences in boxplot
> manova_model <- manova(cbind(Anthracene, Benzo.b.fluoranthene, Benzo.g.h.i.perylene, F
luorene) ~ Extraction, data = data)
>
> # Summary of MANOVA
> summary(manova_model, test = "Pillai")
      Df Pillai approx F num Df den Df Pr(>F)
Extraction 1 0.97761 10.917      4      1 0.2228
Residuals  4
> # Summary of Hotelling's T-square
> summary(hotelling_model, test = "Hotelling-Lawley")
      Df Hotelling-Lawley approx F num Df den Df Pr(>F)
Extraction 1 43.669 10.917      4      1 0.2228
Residuals  4
>
> # Perform multiple comparisons (if MANOVA significant)
> # Get ANOVA tables for individual response variables
> summary.aov(manova_model)
Response Anthracene :
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Extraction 1 166.427 166.427  7.3586 0.05339 .
Residuals  4  90.467  22.617
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Response Benzo.b.fluoranthene :
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Extraction 1  618.14  618.14  1.4413 0.2962
Residuals  4 1715.54  428.88

Response Benzo.g.h.i.perylene :
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Extraction 1 13.2017 13.2017  7.6903 0.05017 .
Residuals  4  6.8667  1.7167
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Response Fluorene :
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Extraction 1 231.88 231.882  3.8915 0.1198
Residuals  4 238.35  59.587

```

**Tabla A9:** Diseño de Plackett y Burman para determinar los factores de la interfaz LC-APCI-HRMS que afectan de manera significativa la respuesta de los HAPs empleando el software SAS-JMP Statistical Discovery™ v13.

Prueba	SG	AG	CT	VT	CC	RF
1	17,5	15	400	400	5	75
2	17,5	5	250	250	4	25
3	30	10	250	250	4	25
4	5	10	400	400	5	75
5	30	5	325	250	5	75
6	5	15	325	400	4	25
7	30	5	250	325	5	75
8	5	15	400	325	4	25
9	30	5	400	400	4,5	25
10	5	15	250	250	4,5	75
11	30	5	400	400	4	50
12	5	15	250	250	5	50
13	30	15	250	400	4	75
14	5	5	400	250	5	25
15	30	15	250	400	5	25
16	5	5	400	250	4	75
17	30	15	400	250	4	75
18	5	5	250	400	5	25
19	30	15	400	250	5	25
20	5	5	250	400	4	75
21	17,5	10	325	325	4,5	50

**Tabla A10:** Resultados del *screening* realizado a partir del diseño de Plackett y Burman para determinar los factores que afectan de manera significativa la respuesta de los HAPs evaluando de manera simultánea 21 combinaciones de diferentes factores seleccionados de la interfaz LC-APCI-HRMS. Efectos principales reportados como factores con la mayor contribución a la varianza del método empleando el software SAS-JMP Statistical Discovery™ v13.

HAPs	Plackett- Burman																					Referencias		%Diferencia 1* vs. 13**	Efectos Principales
	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13**	14	15	16	17	18	19	20	21	PreOpt	TFS		
Acenaphthene	7E+07	1E+07	2E+07	2E+07	3E+07	1E+07	5E+07	1E+07	4E+07	2E+07	6E+07	1E+07	8E+07	3E+06	3E+07	4E+06	3E+07	3E+06	2E+07	6E+06	4E+07	4E+07	5E+07	-14	CT AG VT
Acenaphthene-d8	9E+08	2E+08	2E+08	3E+08	4E+08	2E+08	7E+08	1E+08	5E+08	2E+08	7E+08	2E+08	9E+08	4E+07	4E+08	8E+07	3E+08	4E+07	3E+08	9E+07	4E+08	4E+08	6E+08	-6	CT AG VT
Acenaphthylene	7E+07	6E+06	1E+07	1E+07	2E+07	1E+07	4E+07	9E+06	3E+07	9E+06	5E+07	7E+06	7E+07	1E+06	3E+07	2E+06	2E+07	4E+05	1E+07	3E+06	2E+07	3E+07	4E+07	4	CT AG CC
Anthracene	9E+07	2E+07	3E+07	2E+07	5E+07	1E+07	7E+07	1E+07	5E+07	2E+07	8E+07	2E+07	1E+08	3E+06	4E+07	2E+06	4E+07	3E+06	3E+07	9E+06	5E+07	5E+07	7E+07	-2	CT VT SG
Anthracene-d10	1E+09	3E+08	3E+08	4E+08	6E+08	2E+08	9E+08	2E+08	6E+08	3E+08	1E+09	2E+08	1E+09	5E+07	5E+08	77016	5E+08	5E+07	4E+08	1E+08	6E+08	6E+08	8E+08	10	CT SG AG
Benzo(a)anthracene	1E+08	4E+07	5E+07	5E+07	1E+08	3E+07	1E+08	2E+07	6E+07	4E+07	1E+08	3E+07	2E+08	4E+06	5E+07	2E+07	7E+07	6E+06	5E+07	3E+07	9E+07	8E+07	1E+08	-7	CT VT SG
Benzo(a)anthracene-d12	2E+09	5E+08	6E+08	7E+08	1E+09	3E+08	2E+09	3E+08	8E+08	6E+08	2E+09	4E+08	2E+09	8E+07	6E+08	3E+08	8E+08	8E+07	7E+08	1E+08	1E+09	9E+08	1E+09	-1	CT VT SG
Benzo(a)pyrene	1E+08	4E+07	4E+07	4E+07	9E+07	2E+07	1E+08	2E+07	4E+07	3E+07	8E+07	4E+07	1E+08	4E+06	3E+07	1E+07	5E+07	4E+06	4E+07	9E+06	6E+07	7E+07	9E+07	1	CT VT SG
Benzo(a)pyrene-d12	3E+09	5E+08	6E+08	1E+09	1E+09	6E+08	2E+09	6E+08	1E+09	6E+08	2E+09	3E+08	2E+09	9E+07	7E+08	5E+08	8E+08	6E+07	7E+08	2E+08	1E+09	1E+09	1E+09	33	CT AG SG
Benzo(b)fluoranthene	8E+07	2E+07	3E+07	3E+07	6E+07	1E+07	8E+07	1E+07	3E+07	3E+07	7E+07	1E+07	9E+07	6E+06	3E+07	1E+07	4E+07	6E+06	3E+07	2E+07	4E+07	5E+07	8E+07	-13	CT VT SG
Benzo(b)fluoranthene-d12	1E+09	3E+08	4E+08	4E+08	7E+08	2E+08	1E+09	2E+08	4E+08	3E+08	9E+08	2E+08	1E+09	4E+07	3E+08	1E+08	5E+08	4E+07	3E+08	1E+08	5E+08	5E+08	8E+08	-7	CT VT SG
Benzo(k)fluoranthene	9E+07	2E+07	3E+07	4E+07	7E+07	2E+07	1E+08	1E+07	4E+07	3E+07	8E+07	2E+07	1E+08	6E+06	3E+07	2E+06	4E+07	6E+06	3E+07	3E+06	6E+07	5E+07	9E+07	-7	CT VT SG
Benzo[g,h,i]perylene	9E+07	3E+07	4E+07	3E+07	7E+07	2E+07	9E+07	1E+07	3E+07	3E+07	8E+07	2E+07	9E+07	7E+06	2E+07	1E+07	4E+07	4E+06	3E+07	2E+07	5E+07	5E+07	9E+07	2	CT VT SG
Benzo[g,h,i]perylene-d12	2E+09	3E+08	4E+08	1E+09	1E+09	3E+08	1E+09	4E+08	8E+08	5E+08	2E+09	3E+08	2E+09	9E+07	5E+08	3E+08	7E+08	7E+07	5E+08	4E+08	9E+08	8E+08	1E+09	61	CT SG AG
Chrysene	1E+08	4E+07	5E+07	5E+07	1E+08	3E+07	1E+08	2E+07	6E+07	4E+07	1E+08	3E+07	2E+08	4E+06	5E+07	2E+07	7E+07	6E+06	5E+07	3E+07	9E+07	8E+07	1E+08	-7	CT VT SG
Chrysene-d12	2E+09	5E+08	6E+08	7E+08	1E+09	3E+08	2E+09	3E+08	8E+08	6E+08	2E+09	4E+08	2E+09	8E+07	6E+08	3E+08	8E+08	9E+07	7E+08	1E+08	1E+09	9E+08	1E+09	-1	CT VT SG
Dibenz[a,h]anthracene	7E+07	2E+07	2E+07	3E+07	6E+07	9E+06	7E+07	1E+07	2E+07	2E+07	6E+07	1E+07	7E+07	3E+06	2E+07	8E+06	3E+07	2E+06	2E+07	1E+07	4E+07	3E+07	6E+07	3	CT SG VT
Dibenz[a,i]pyrene-d14	1E+09	2E+08	2E+08	4E+08	5E+08	2E+08	8E+08	2E+08	3E+08	2E+08	8E+08	1E+08	8E+08	1E+08	2E+08	3E+08	2E+08	1E+08	2E+08	3E+08	5E+08	4E+08	7E+08	36	CT SG VT
Fluoranthene	9E+07	2E+07	2E+07	2E+07	4E+07	2E+07	7E+07	1E+07	4E+07	2E+07	8E+07	1E+07	9E+07	1E+06	3E+07	6E+06	4E+07	2E+06	3E+07	6E+06	5E+07	4E+07	7E+07	-5	CT VT SG
Fluoranthene-d10	8E+08	2E+08	3E+08	3E+08	5E+08	2E+08	7E+08	1E+08	4E+08	3E+08	7E+08	1E+08	9E+08	2E+07	4E+08	8E+07	4E+08	3E+07	3E+08	6E+07	4E+08	5E+08	7E+08	-9	CT VT AG
Fluorene	3E+07	3E+06	6E+06	8E+06	1E+07	6E+06	2E+07	4E+06	2E+07	5E+06	3E+07	3E+06	3E+07	9E+05	2E+07	2E+06	1E+07	8E+05	1E+07	7E+05	1E+07	1E+07	2E+07	2	CT AG SG
Fluorene-d10	7E+08	1E+08	2E+08	2E+08	3E+08	1E+08	5E+08	1E+08	4E+08	2E+08	6E+08	1E+08	8E+08	2E+07	3E+08	3E+07	2E+08	2E+07	2E+08	3E+07	3E+08	3E+08	5E+08	-12	CT AG VT
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	4E+08	1E+08	1E+08	1E+08	3E+08	6E+07	4E+08	6E+07	1E+08	1E+08	3E+08	8E+07	4E+08	3E+07	1E+08	4E+07	2E+08	1E+07	1E+08	7E+07	2E+08	2E+08	4E+08	2	CT VT SG
Naphthalene	6E+07	5E+06	9E+06	1E+07	1E+07	1E+07	3E+07	8E+06	3E+07	8E+06	5E+07	7E+06	6E+07	1E+06	3E+07	2E+06	1E+07	1E+06	1E+07	1E+06	2E+07	2E+07	3E+07	-8	CT AG VT
Naphthalene-d8	6E+08	7E+07	1E+08	2E+08	2E+08	1E+08	4E+08	1E+08	3E+08	1E+08	5E+08	8E+07	6E+08	1E+07	3E+08	2E+07	2E+08	2E+07	1E+08	3E+07	2E+08	3E+08	4E+08	-13	CT AG VT
Phenanthrene	6E+07	8E+06	1E+07	1E+07	2E+07	1E+07	4E+07	8E+06	3E+07	1E+07	5E+07	8E+06	7E+07	8E+05	3E+07	2E+06	2E+07	6E+05	2E+07	1E+06	3E+07	3E+07	4E+07	-7	CT AG VT
Phenanthrene-d10	8E+08	1E+08	2E+08	2E+08	3E+08	2E+08	6E+08	1E+08	4E+08	2E+08	7E+08	1E+08	9E+08	1E+07	4E+08	2E+07	3E+08	2E+07	2E+08	4E+07	4E+08	4E+08	6E+08	-15	CT AG VT
Pyrene	9E+07	2E+07	3E+07	3E+07	5E+07	2E+07	8E+07	2E+07	4E+07	2E+07	8E+07	1E+07	1E+08	2E+06	4E+07	6E+06	4E+07	3E+06	3E+07	1E+07	5E+07	5E+07	8E+07	-11	CT VT SG
Pyrene-d10	1E+09	2E+08	4E+08	4E+08	6E+08	2E+08	9E+08	2E+08	5E+08	3E+08	9E+08	2E+08	1E+09	4E+07	4E+08	8E+07	5E+08	5E+07	4E+08	9E+07	5E+08	6E+08	8E+08	-4	CT VT SG

**Tabla A11:** Modelo de Superficie de respuesta (RSM) para interfaz LC-APCI-HRMS calculadas con el software SAS-JMP Statistical Discovery™ v13.

CT: Temperatura del capilar, VT: Temperatura de vaporización.

HAP o HAP-dx	Polinomios de segundo grado, $a + bx + cy + dxy + ex^2 + fy^2$ , donde $x: (CT - 325) / 75$ , $y: (VT - 325) / 75$ .
Acenaphthene	$13005926,78 - 14715982,83 * x + 11672548,67 * y - 12067063,75 * xy - 9795740,17 * x^2 + 36987753,33 * y^2$
Acenaphthene-d8	$169602981,56 - 143746464 * x + 135534702 * y - 143471565,25 * xy - 117582639,33 * x^2 + 419842735,67 * y^2$
Anthracene	$18870331,56 - 15037529,83 * x + 14413794 * y - 14039316,25 * xy - 14412416,83 * x^2 + 44679293,67 * y^2$
Anthracene-d10	$231413260,78 - 164832438,33 * x + 168954698 * y - 168010204,75 * xy - 180184854,67 * x^2 + 590150218,33 * y^2$
Benz(a)anthracene	$41463630,67 - 20027833,83 * x + 20701334 * y - 28983358,75 * xy - 29960925,5 * x^2 + 64903313 * y^2$
Benz(a)anthracene-d12	$525051254,22 - 199893613,17 * x + 261548771,5 * y - 368351507,5 * xy - 347529142,83 * x^2 + 777849140,17 * y^2$
Benzo(a)pyrene	$29061436,11 - 7329488,33 * x + 13518390 * y - 21180810,5 * xy - 17255865,67 * x^2 + 41664544,33 * y^2$
Benzo(a)pyrene-d12	$760770897,56 - 172393670,5 * x + 367142323 * y - 459403641,75 * xy - 648978330,83 * x^2 + 1209346958,67 * y^2$
Benzo(b)fluoranthene	$22788739 - 10842596,17 * x + 14825191,5 * y - 19757285 * xy - 13467601,5 * x^2 + 33673561,5 * y^2$
Benzo(b)fluoranthene-d12	$242404216,56 - 103614628,33 * x + 138087439,5 * y - 227490922 * xy - 153597152,33 * x^2 + 435761700,17 * y^2$
Benzo(k)fluoranthene	$19566843,11 - 11738997,5 * x + 13304466,5 * y - 21734959 * xy - 14237842,17 * x^2 + 47221944,83 * y^2$
Benzo[g,h,i]perylene	$26238201,22 - 8340444,17 * x + 13094492,5 * y - 19442856,5 * xy - 17834349,83 * x^2 + 38025386,17 * y^2$
Benzo[g,h,i]perylene-d12	$620976117,56 - 108608321,83 * x + 267634180,67 * y - 345477839 * xy - 555974470,83 * x^2 + 934527252,67 * y^2$
Chrysene	$41463630,67 - 20027833,83 * x + 20701334 * y - 28983358,75 * xy - 29960925,5 * x^2 + 64903313 * y^2$
Chrysene-d12	$531887495,67 - 202506558,83 * x + 261548771,5 * y - 368351507,5 * xy - 346927585,5 * x^2 + 770611860,5 * y^2$
Dibenz[a,h]anthracene	$19107616,78 - 5950466,833 * x + 9758751,17 * y - 15486960,25 * xy - 13981843,17 * x^2 + 28926221,83 * y^2$
Dibenz[a,i]pyrene-d14	$389163349 - 56753039 * x + 117761634,67 * y - 189927908,75 * xy - 291674504 * x^2 + 336199984 * y^2$
Fluoranthene	$18726659,22 - 14251397,17 * x + 14229058 * y - 14740404,25 * xy - 16162293,83 * x^2 + 41576650,67 * y^2$
Fluoranthene-d10	$180924108 - 128241774,33 * x + 127306234,67 * y - 167658397 * xy - 130294153 * x^2 + 414671697 * y^2$
Fluorene	$4767765,11 - 5605850 * x + 4991018,333 * y - 4551192 * xy - 4562676,66666667 * x^2 + 15745545,33 * y^2$
Fluorene-d10	$109485153,11 - 127486307,5 * x + 122085488,5 * y - 121322149,25 * xy - 86656033,17 * x^2 + 349199195,83 * y^2$
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	$99417259,78 - 33361776,33 * x + 52377969,67 * y - 77771425,25 * xy - 68016072,67 * x^2 + 155422871,33 * y^2$
Naphthalene	$6986260,333 - 11030347,5 * x + 10380049,83 * y - 9056557,5 * xy - 6502577,5 * x^2 + 28647081,5 * y^2$
Naphthalene-d8	$74335107,22 - 109533686,17 * x + 100948725,67 * y - 95683934,25 * xy - 56453852,83 * x^2 + 296015968,67 * y^2$
Phenanthrene	$9561863,88888889 - 11663980 * x + 10636909,83 * y - 10329665 * xy - 8921482,333 * x^2 + 31266776,17 * y^2$
Phenanthrene-d10	$122178491,22 - 146102919,67 * x + 139011535,5 * y - 143461492 * xy - 95887344,33 * x^2 + 402740966,17 * y^2$
Pyrene	$19264877,67 - 14798055,5 * x + 14613458,67 * y - 16681025,75 * xy - 14720513,5 * x^2 + 45553378 * y^2$
Pyrene-d10	$218958082,44 - 146143063,17 * x + 158200826,33 * y - 193519750 * xy - 151139101,17 * x^2 + 511977112,33 * y^2$

**Tabla A12:** Resultados de la determinación de HAPs por extracción con AcOEt, transesterificación y análisis por GC-MS/MS. (Grupo I)

Muestra	Naphthalene					Acenaphthene					Fluorene					Phenanthrene					
	GC-MS/MS	LC-APCI-HRMS	Conc. (RSD)			GC-MS/MS	LC-APCI-HRMS	Conc. (RSD)			GC-MS/MS	LC-APCI-HRMS	Conc. (RSD)			GC-MS/MS	LC-APCI-HRMS	Conc. (RSD)			
Ref,	n	$\Delta$ Rt (min)	IR (%)	$\Delta$ Rt (min)	$\Delta$ m/m (ppm)	ug/kg (%)	$\Delta$ Rt (min)	IR (%)	$\Delta$ Rt (min)	$\Delta$ m/m (ppm)	ug/kg (%)	$\Delta$ Rt (min)	IR (%)	$\Delta$ Rt (min)	$\Delta$ m/m (ppm)	ug/kg (%)	$\Delta$ Rt (min)	IR (%)	$\Delta$ Rt (min)	$\Delta$ m/m (ppm)	ug/kg (%)
M1	1	0,01	3,8			229,8	0,01	9,5			32,6	0,01	3,1	-0,01	-3,69	32,2	0,01	8,0	0,08	-0,10	32,8
	2	0,01	5,9	N,D,		(27,9)	0,01	13,5	N,D,		(13)	0,01	12,5	0,01	-3,69	(11,2)	0,01	8,7	0,07	-0,10	(17,6)
	3	0,01	2,2				0,02	10,0				0,01	21,9	-0,01	-2,95		0,01	8,7	0,07	0,50	
M2	1	0,01	4,4			196,6	0,02	27,1			36,6	0,01	19,4	-0,01	-3,69	36,6	0,01	9,3	0,07	0,24	39,1
	2	0,01	1,3	N,D,		(30,5)	0,02	51,7	N,D,		N,I,	0,01	2,7	0,04	-3,41	(11)	0,01	8,9	0,07	-0,10	(31,4)
	3	0,01	8,6				0,02	42,3				0,01	18,9	0,01	-3,14		0,01	9,9	0,07	-0,18	
M3	1	0,01	0,2			209,1	0,02	88,0			38,4	0,01	14,0	0,00	-3,69	38,4	0,01	8,5	0,08	-0,01	41,9
	2	0,01	2,8	N,D,		(30)	0,01	153,8	N,D,		N,I,	0,01	14,7	-0,01	-3,78	(20,2)	0,01	8,2	0,07	0,50	(13,4)
	3	0,01	3,7				0,02	42,8				0,01	18,1	-0,02	-4,42		0,01	8,5	0,08	0,07	
M4	1	0,01	5,8			140	0,02	146,5			41,3	0,01	16,0	-0,01	-4,42	41,3	0,01	7,8	0,07	-0,01	51,2
	2	0,01	7,0	N,D,		(26,3)	0,01	48,4	N,D,		N,I,	0,02	6,1	0,01	-3,32	(34,9)	0,02	10,1	0,08	-0,36	(55,2)
	3	0,01	7,3				0,02	41,6				0,01	32,0	-0,01	-3,41		0,01	9,9	0,07	-1,30	
M5	1	0,01	3,7			170,1	0,01	12,6			39,2	0,02	28,3	0,02	-2,95	39,2	0,02	8,9	0,08	-0,36	29,7
	2	0,01	2,5	N,D,		(34,8)	0,02	33,4	N,D,		(15,5)	0,02	19,4	0,01	-4,33	(19,5)	0,01	6,2	0,08	-0,27	(14,9)
	3	0,01	7,3				0,01	2,0				0,01	16,6	0,00	-3,96		0,01	9,0	0,08	-0,10	
M6	1	0,01	2,0			211,1	0,02	27,4	0,01	-4,37	35,1	0,01	20,0	0,07	-3,05	35,1	0,01	10,1	0,08	1,53	39,5
	2	0,01	2,4	N,D,		(19,2)	0,02	60,1	0,01	-3,88	N,I,	0,01	14,3	0,06	-2,95	(14,3)	0,01	5,6	0,07	1,02	(20)
	3	0,01	4,2				0,02	37,2	0,00	-4,17		0,01	7,7	0,07	-3,05		0,01	8,3	0,08	1,36	
M7	1	0,01	4,7			200,9	0,02	84,1	0,01	-3,88	44,9	0,01	1,2	0,06	-2,95	44,9	0,01	5,7	0,08	1,10	43,9
	2	0,01	22,6	N,D,		(30,6)	0,02	81,5	0,00	-4,87	N,I,	0,01	12,5	0,05	-4,33	(21,4)	0,01	10,5	0,07	1,44	(30)
	3	0,01	1,9				0,03	80,0	0,00	-4,07		0,01	4,4	0,04	-3,6		0,01	6,2	0,08	1,27	
M8	1	0,01	1,1			264,7	0,02	67,5	0,01	-4,47	32,5	0,01	18,7	0,06	-3,32	32,5	0,01	7,3			29,6
	2	0,01	3,9	N,D,		(19,5)	0,05	42,9	0,00	-4,47	N,I,	0,00	16,2	0,05	-3,69	(25)	0,00	8,5		N,D,	(31)
	3	0,01	0,6				0,04	47,8	0,00	-4,37		0,00	19,6	0,04	-3,14		0,01	10,3			

**Tabla A13:** Resultados de la determinación de HAPs por extracción con AcOEt, transesterificación y análisis por GC-MS/MS. (Grupo II).

Muestra	Anthracene					Fluoranthene					Pyrene					Crysene					
	GC-MS/MS	LC-APCI-HRMS	Conc. (RSD)			GC-MS/MS	LC-APCI-HRMS	Conc. (RSD)			GC-MS/MS	LC-APCI-HRMS	Conc. (RSD)			GC-MS/MS	LC-APCI-HRMS	Conc. (RSD)			
Ref,	n	$\Delta$ Rt (min)	IR (%)	$\Delta$ Rt (min)	$\Delta$ m/m (ppm)	ug/kg (%)	$\Delta$ Rt (min)	IR (%)	$\Delta$ Rt (min)	$\Delta$ m/m (ppm)	ug/kg (%)	$\Delta$ Rt (min)	IR (%)	$\Delta$ Rt (min)	$\Delta$ m/m (ppm)	ug/kg (%)	$\Delta$ Rt (min)	IR (%)	$\Delta$ Rt (min)	$\Delta$ m/m (ppm)	ug/kg (%)
M1	1	0,01	6,7	0,06	-0,10		0,02	3,6				0,02	0,3	0,00	-3,41		0,01	18,4			
	2	0,01	18,2	0,06	-0,36	<LOQ	0,02	5,2	N,D,	<LOQ		0,01	0,5	0,00	-4,16	<LOQ	0,01	5,2	N,D,	<LOQ	
	3	0,01	5,4	0,06	-0,27		0,01	0,0				0,01	2,2	-0,01	-3,48		0,01	26,6			
M2	1	0,01	9,2	0,07	0,07		0,01	0,4				0,01	0,3	0,00	-3,94		0,02	7,2			
	2	0,01	18,3	0,06	-0,36	<LOQ	0,01	1,4	N,D,	<LOQ		0,01	3,2	0,00	-4,24	<LOQ	0,02	13,1	N,D,	<LOQ	
	3	0,01	4,3	0,06	-0,78		0,01	0,3				0,01	1,4	0,01	-4,24		0,03	26,2			
M3	1	0,01	3,0	0,06	-0,27		0,01	0,5				0,01	0,1	0,00	1,122		0,02	18,2			
	2	0,01	1,8	0,06	-0,18	<LOQ	0,02	3,4	N,D,	4,6* (25,9)		0,01	2,6	0,00	-4,24	5,6* (15,7)	0,00	0,03	N,D,	<LOQ	
	3	0,01	3,6	0,06	-0,36		0,01	4,8				0,01	0,3	0,00	-3,26		0,03	12,3			
M4	1	0,01	15,7	0,06	-0,36		0,01	4,1				0,01	1,9	0,00	-4,09		0,03	21,5			
	2	0,01	3,3	0,06	-0,18	<LOQ	0,02	2,1	N,D,	10,4 (28,5)		0,02	0,1	0,00	-2,81	13,6 (25,2)	0,00	5,8	N,D,	<LOQ	
	3	0,01	12,6	0,06	-1,21		0,01	1,7				0,01	2,1	-0,01	-2,96		0,03	26,9			
M5	1	0,01	0,8	0,07	-0,44		0,02	2,6				0,02	1,5	0,01	-4,16		0,01	18,0			
	2	0,01	3,1	0,07	-0,36	<LOQ	0,02	2,6	N,D,	<LOQ		0,01	0,7	0,00	-3,71	<LOQ	0,01	18,2	N,D,	<LOQ	
	3	0,01	5,4	0,07	-0,36		0,01	2,5				0,01	2,2	0,00	-3,79		0,02	5,9			
M6	1	0,01	4,6	0,07	-0,10		0,01	2,1				0,01	5,4	0,02	-2,96		0,03	12,0			
	2	0,01	17,4	0,06	0,24	<LOQ	0,02	1,3	N,D,	<LOQ		0,01	0,2	0,03	-3,64	<LOQ	0,02	4,0	N,D,	<LOQ	
	3	0,01	3,9	0,07	0,07		0,01	5,1				0,01	6,1	0,01	-3,86		0,02	18,9			
M7	1	0,01	1,1	0,07	0,24		0,01	2,9				0,01	0,5	0,02	-3,48		0,02	12,3			
	2	0,01	3,8	0,06	-0,36	<LOQ	0,01	1,3	N,D,	<LOQ		0,01	5,0	-0,01	-3,79	<LOQ	0,04	8,6	N,D,	<LOQ	
	3	0,01	19,8	0,06	-0,87		0,01	3,8				0,00	1,7	0,01	-3,03		0,05	16,6			
M8	1	0,01	2,0	0,06	0,24		0,01	3,6				0,01	7,0	0,00	-3,56		0,03	4,2			
	2	0,01	6,4	0,06	0,07	<LOQ	0,01	3,6	N,D,	<LOQ		0,02	4,1	0,00	-3,11	<LOQ	0,12	13,0	N,D,	<LOQ	
	3	0,01	5,8	0,06	-0,36		0,02	3,2				0,03	0,0	0,00	-3,41		0,09	13,0			

\*(&lt;LOQ, pero se entrega resultado del cálculo a modo informativo para esta muestra)

## B. Anexo: Productos de Investigación

Listado de participaciones y productos de divulgación del conocimiento:

1. Assessment of Complementary Atmospheric Pressure Ionization Techniques in Multi-Class Mycotoxin Analysis by LC-HRMS. American Society of Mass Spectrometry - ASMS. · Nov 14, 2019. (Poster).
2. A green-footprint approach based on in-tube dSPME for parallel and fast multiclass analysis of contaminants in roasted coffee via LC-HRMS. 9th LAPRW. Latin American Pesticide Residue Workshop, Food and Environment, Ciudad de Panamá, Panamá. · May 21-24, 2023 (Plenary/ Speaker).
3. Efficient sample preparation and analysis in multiresidue applications. 9th LAPRW. Latin American Pesticide Residue Workshop, Food and Environment, Ciudad de Panamá, Panamá. · May 21-24, 2023 (Pre-workshop course / Lecturer).
4. Analysis of complex coffee bean contaminants with high-resolution mass spectrometry. The Scientists' Channel. Select Science. 23 Sep 2022.  
<https://www.thescientistschannel.com/susanne-ekroth>
5. A green-footprint approach for parallel multiclass analysis of contaminants in roasted coffee via LC-HRMS. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Springer. (Research paper - Accepted).
6. Tiered Development of a PAH analysis for Roasted Coffee: A Mini-Method Approach. International Symposium on Food Safety and Control. International Atomic Energy Agency - IAEA, Vienna, Austria. · Nov 27-31, 2024. (Poster).

# Producto 1. Assessment of Complementary Atmospheric Pressure Ionization Techniques in Multi-Class Mycotoxin Analysis by LC-HRMS. (Poster # 8)



## American Society for Mass Spectrometry

2010 Calverton Street, Building I, Suite Fe, NM 87505  
(505) 989-4517 | Fax: (505) 989-1073 | info@asms.org

November 14, 2019

Julio César España Amórtegui

Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas

Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá

Ciudad Universitaria Av. Ciudad de quito N° 45-03 Ed. 451 Of. 205

jespanaa@unal.edu.co

### CERTIFICATE OF ATTENDANCE Fall Workshop on Atmospheric Pressure Ionization

This is to certify that Julio César España Amórtegui attended the  
Fall Workshop on Atmospheric Pressure Ionization on November 14 – 15, 2019 at the Sonesta Hotel,  
Philadelphia, Pennsylvania, USA.

#### FEES PAID

Fall Workshop Registration, \$175.00

Paid on October 17, 2019

ASMS was formed in 1969 to promote and disseminate knowledge of mass spectrometry and allied topics. Membership includes over 6,500 scientists involved in research and development. Members come from academic, industrial and governmental laboratories. Their interests include advancement of techniques and instrumentation in mass spectrometry, as well as fundamental research in chemistry, geology, biological sciences and physics. Further information on the activities of ASMS are available on the web site: [www.asms.org](http://www.asms.org).

Judith A. Sjoberg  
Conference Registrar

These posters will be on display in the back of the workshop room. This is an informal poster session so there is not a set presentation time. The presenters have been instructed to be near their posters during the breaks.

- An Emerging Technology for Hit Discovery and Compound Profiling: Comparing Acoustic Mist Ionization-Mass Spectrometry to Conventional High-Throughput Screening Technology;** Arseniy M Belov<sup>1</sup>, Joseph Kozole<sup>1</sup>, Carl A Machuga<sup>2</sup>, Guofeng Zhang<sup>2</sup>, Melanie V Leveridge<sup>2</sup>, Luke Ghislaia<sup>2</sup>, Sammy S Datwani<sup>2</sup>, Roland S Anna<sup>2</sup>, <sup>1</sup>GlaxoSmithKline, *Discovery Analytical, Collegeville, PA*; <sup>2</sup>GlaxoSmithKline, *Screening, Profiling and Mechanistic Biology, Collegeville, PA*; <sup>3</sup>Labcyte, *San Jose, CA*
- Induction Based Fluidics: A Decade of Applications with Discussion of Fundamentals;** Ron Shong<sup>1</sup>; Andrew D Sauter, III<sup>2</sup>; Drew Sauter<sup>2</sup>; <sup>1</sup>Adaptis Solutions, *Palmox, MA*; <sup>2</sup>Nanoflur LLC, *Henderson, NV*
- Mass Spectrometry-Based Study of Diverse Metabolome from Overexpressed Type III Polyketide Synthase and Modifying Enzymes;** Gurkha Raj Giri<sup>1</sup>; *South Asian University, New Delhi, India*
- Effects of Interfacial Surface Interactions on Cone-Jet Mode Electrospray Ionization;** Sam Ian Stants<sup>1</sup>; Anna Stolzfus<sup>1</sup>; Eliana McCreary<sup>1</sup>; Andris Suma<sup>2</sup>; <sup>1</sup>Phoenix S & T, *Chadds Ford, PA*
- Versatile applications with Metalspray in Mass Spectrometry Using an Omnipolar Surface;** Michael C Godwin<sup>1</sup>; William D Hoffmann<sup>1</sup>; <sup>1</sup>Texas State University, *San Marcos, TX*
- A Comparison of Electrospray Ionization (ESI) and Paper Spray (PS) Ionization for the Analysis of Polyfluoroalkyl Substances (PFAS);** Taylor K Keshar<sup>1</sup>; Megan R. Osgorbeck<sup>1</sup>; Gary L. Ghisla<sup>1</sup>; <sup>1</sup>University of North Carolina, *Chapel Hill, NC*
- Addition of Serine Improves Protein Analysis during DESI-MS;** Roshan Jayavardh<sup>1</sup>; *Western Michigan University, Kalamazoo, MI*
- Assessment of Complementary Atmospheric Pressure Ionization Techniques in Multi-Class Mycotoxin Analysis by LC-HRMS;** Julio César España<sup>1</sup>; Jairo Arturo Guerrero Dallos<sup>1</sup>; <sup>1</sup>Universidad Nacional de Colombia, *Bogotá, Colombia*
- Delayed Desorption Improves Protein Analysis by DESI-MS;** Tara L Maser<sup>1</sup>; Eliahe Honarvar<sup>2</sup>; Andre Venter<sup>2</sup>; <sup>1</sup>Western Michigan University, *Kalamazoo, MI*
- An Inexpensive Ultrasonic Desorption-Atmospheric Pressure Chemical Ionization for Broadband Liquid Sampling;** Lixia Song<sup>1</sup>; Yi You<sup>1</sup>; Nelson Rapalo Perdomo<sup>1</sup>; Theresa Evans-Nguyen<sup>2</sup>; <sup>1</sup>University of South Florida, *Tampa*; <sup>2</sup>Federal Institute for Materials Research and Testing, *Berlin, Germany*
- Solution Composition Effects on Charge State Distributions of Protein Ions Formed by Negative or Positive Mode Electrospray Ionization Mass Spectrometry;** Muhammad A Zamilid<sup>1</sup>; Carter Lant<sup>1</sup>; Rachel Ogorzalek Loo<sup>1</sup>; Joseph A Loo<sup>1</sup>; <sup>1</sup>University of California, *Los Angeles, Los Angeles, CA*
- Differential Analysis of Lipid Signal with Grounded and Charged DESI Emitter Potentials by FT-ICR MS;** Kevin J Zemaitis<sup>1</sup>; Troy D Wood<sup>1</sup>; <sup>1</sup>University at Buffalo, *Buffalo, NY*
- Deinococcus Radiodurans Transfer RNA Modified Nucleosides are Minimally Impacted UV Radiation;** Roxsai Zhao<sup>1</sup>; Spencer Parrish<sup>1</sup>; Robert Ross<sup>1</sup>; Balasubrahanyam Addepalli<sup>1</sup>; Patrick A Limbach<sup>1</sup>; <sup>1</sup>University of Cincinnati, *Cincinnati, OH*

### Assessment of Complementary Atmospheric Pressure Ionization Techniques in Multi-Class Mycotoxin Analysis by LC-HRMS

Julio César España<sup>1</sup>, Jairo Arturo Guerrero<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Universidad Nacional de Colombia, Science Faculty, University School, Bogotá D.C.

#### Introduction

The globalized scheme held in the agroindustry has led to increase food safety concerns about natural toxins in material of both plant and animal origin. Mycotoxins are known to be toxic and harmful for humans and animals. These secondary metabolites naturally shown different structures of chemically disparate traditions that feature a wide range of physicochemical properties. This great diversity challenges the analytical methods since thereby largely affect robustness and comparable sensitivity in routine.

#### Experimental

A suite of 5 compounds represented three different mycotoxin classes were run in the polarity switching mode. Fig. N1 shows pKas of Aflatoxin B1 and B2 (AFB1, AFB2), Patulin (PAT), Alternariol (ALT), Alternariol dimethyl ether (AMED) and Alternariol (ATEX) and Ochratoxin A (OTA).

Fig. N1. PKa values for the 5 mycotoxins in the study. High and low water content samples (low A and physisol) were extracted following the OCN version of the QuEChERS method [1] in Fig. N2. Then, the extracts were sequentially diluted to assess the matrix effect by the increasing amount of matrix (load of indigenous compounds).

Fig. N2. QuEChERS method to generate matrix extracts.

Fig. N3. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N4. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N5. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N6. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N7. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N8. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N9. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N10. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N11. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N12. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N13. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N14. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N15. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N16. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N17. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N18. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N19. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N20. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N21. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N22. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N23. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N24. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N25. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N26. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N27. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N28. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N29. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N30. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N31. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N32. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N33. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N34. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N35. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N36. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N37. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N38. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N39. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N40. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N41. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N42. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N43. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N44. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N45. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N46. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N47. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N48. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N49. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N50. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N51. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N52. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N53. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N54. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N55. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N56. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N57. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N58. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N59. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N60. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N61. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N62. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N63. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N64. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N65. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N66. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N67. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N68. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N69. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N70. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N71. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N72. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N73. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N74. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N75. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N76. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N77. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N78. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N79. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N80. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N81. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N82. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N83. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N84. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N85. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N86. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N87. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N88. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N89. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N90. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N91. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N92. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N93. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N94. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N95. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N96. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N97. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N98. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N99. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

Fig. N100. HESI-MS/MS method to generate matrix extracts.

#### Results and discussion

The effect of factors such as mobile phase composition on ESI-MS response has been recently evaluated [2] finding that functional groups that had higher affinity towards low (L) and high (H) water content. The responses in Fig. N7 and Fig. N8 were calculated as a percentage, relative to the response of a dilution factor up to 400 fold, meant to be a reference with the least amount of matrix. In the case of MeOH by HESI, the responses rely on a number of factors (type, load + compound-specific) with a singular drop on Alternariol, yet not present in the ACN assays. A general increase of responses with the dilution factor may be hypothesis of competition addressed by the "dilute-and-shoot" approach, often challenged when really low limits are required on complex matrices, even in dry material (i.e. dried cereals seedling). Conversely, though not connected, Fig. N9 shows responses with no such dependency in case for most compounds, at least ACN.

Higher responses were obtained for MeOH in HESI for all compounds in the study. However, a 10x in sensitivity was observed in APCI for ACN, and particularly OTA, in APCI was much more sensitive using the apcxi solvent. Apparent discrimination had been obtained for APCI. Since tests in neat solvent are far from real applications, assessment against matrix was performed. The "ME" helps to understand the effect of the matrix present in a sample. The choice of ACN helped to overcome the matrix effect [3] observed in analyses not carried out as Alternariol and Alternariol dimethyl ether suppression and enhancement, resp. (Fig. N5). This confirms that, while ACN, a relevant discrimination [3] is probably related with the effect that MeOH has in compounds not readily ionized in solution, leading to a matrix effect which is highly compound-specific.

No strong competition was found by MeOH/acid from OTA (fully ionized at pH 5.5 Fig. N6), either positive and negative ionization modes have not shown ME. When using APCI, enhancement had no relation with structure in both solvents. Though less sensitive, the ruggedness of ACN vs. MeOH is key for the use of HESI in routine.

#### Conclusions

Under limited access to isotopically-labeled standards of all analytes, but also metabolites in multiclass residue analysis, a robustness improvement was accomplished with the use of ACN, as no effect of ionization was shown in the case of neat matrix (HESI). However, better use APCI (with ACN) since the response of each of the compound classes do not heavily rely on the type and load of matrix. The use of APCI can be called when direct sensitivity is not required, but it has to be evaluated to be constant. Polarity switching enabled a single analysis for each trial that can extend the scope of mycotoxin profiling by the use of ACN in both HESI and APCI, the latter less dependent on the structural features of the molecules within the study.

#### References

[1] Ghisla, L., et al. (2018). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 29(1), 175-187.

[2] Ghisla, L., et al. (2018). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 29(1), 175-187.

[3] Ghisla, L., et al. (2018). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 29(1), 175-187.

#### Acknowledgements

Microbiology Research Project (2018-2019) from the University of the Pacific (UP) and the National University of Colombia (UNAL).

UP: <http://www.up.edu.pe>

UNAL: <http://www.unal.edu.co>

#### Contact

Microbiology Research Project (2018-2019) from the University of the Pacific (UP) and the National University of Colombia (UNAL).

UP: <http://www.up.edu.pe>

UNAL: <http://www.unal.edu.co>

**Producto 2.**A green-footprint approach based on in-tube dSPME for parallel and fast multiclass analysis of contaminants in roasted coffee via LC-HRMS. (plenaria 22 de mayo 2023) Disponible en <https://www.laprw2023.com/programa>

21 May 2023 Sunday	22 May 2023 Monday ANALYTICAL METHODS	23 May 2023 Tuesday ENVIRONMENT	24 May 2023 Wednesday LEGISLATION/REGULATION	25 May 2023 Thursday
<p>PRE-WORKSHOP COURSES</p> <p>Course #1: 9:00 - 12:00</p> <p>Ekroth Susanne Julio Cesar España Steven Lehotay</p> <p>Efficient Sample Preparation and Analysis in Multiresidue Applications</p>	<p>9:00 9:30</p> <p><b>Carmen Ferrer</b> Dual channel liquid chromatography: a versatile technique to improve quality and sample throughput</p>	<p>9:00 9:30</p> <p><b>Félix Hernández</b> Use of GC-HRMS and LC-HRMS for wide-scope screening of pesticide residues</p>	<p>9:00 9:30</p> <p><b>Luis Carrasco-EFSA</b> New figures on the 2021 EU annual report on pesticides residues in food</p>	<p>POST-WORKSHOP COURSES</p> <p>Course #3: 9:00 - 12:00</p> <p>Félix Hernández</p> <p>Analysis of pesticides and emerging contaminants in water: strategies and validation of analytical methods</p>
	<p>9:35 9:55</p> <p><b>Hermann Unterlugauer</b> FATChers – a straight forward multi-residue approach in food of animal origin and far beyond</p>	<p>9:35 9:55</p> <p><b>Karina Miglioranza</b> Impact of land use on the dynamics of organic pollutants in pollinators (bees and bumblebees) and their environment.</p>	<p>9:35 9:55</p> <p><b>Nuri Gras AOAC</b> Programas de AOAC Internacional: Desafíos para la Región de Latinoamérica y El Caribe</p>	
	<p>10:00 10:20</p> <p><b>Julio Cesar España</b> A green-footprint approach based on in-tube dSPME for parallel and fast multiclass analysis of contaminants in roasted coffee via LC-HRMS</p>	<p>10:00 10:20</p> <p><b>Verónica Cesio</b> Developing Biobeds: from basic to applied science</p>	<p>10:00 10:20</p> <p><b>Adriana Torres (ANVISA)</b> Pesticide Dietary Risk Assessment and Brazilian Program on Pesticide Residue Analysis in Food (PARA)</p>	
	<p>10:20 10:30</p> <p><b>QUESTIONS AND DISCUSSION</b></p>	<p>10:20 10:30</p> <p><b>QUESTIONS AND DISCUSSION</b></p>	<p>10:20 10:30</p> <p><b>QUESTIONS AND DISCUSSION</b></p>	
	<p>10:30 10:50</p> <p><b>VENDOR SESSION</b> <b>AGILENT TECHNOLOGIES - Grassi, D.</b> Agilent Solutions for the Analysis of Pesticides Residues in Food</p>	<p>10:30 10:50</p> <p><b>VENDOR SESSION</b> <b>THERMO FISHER SCIENTIFIC - Polo, S.J.</b> Pesticide residues quantification in garlic and cumin using Thermo Scientific Orbitrap Exploris 120 high-resolution accurate mass spectrometer</p>	<p>10:30 10:50</p> <p><b>VENDOR SESSION</b> <b>LAB INSTRUMENTS SRL - Cabrices, O.</b> How confident are you that your residue testing laboratory provides reliable analytical results?</p>	
	<p>10:50 11:20</p> <p><b>COFFEE BREAK</b> <b>VENDOR SESSION</b> <b>SCIEX - Barkowitz, G.</b> Introducing robustness into your polar pesticide testing</p>	<p>10:50 11:20</p> <p><b>COFFEE BREAK</b> <b>VENDOR SESSION</b> <b>UCT - Shelly, D.</b> Two Novel Sorbents for Removing Chlorophyll and Lipids from QuEChERS Extracts</p>	<p>10:50 11:20</p> <p><b>COFFEE BREAK</b> <b>VENDOR SESSION</b> <b>BAYER - Carvalho, F.</b> Coffee: Arabica &amp; Conilon: Architecture X Residue</p>	

**Producto 3.** Efficient sample preparation and analysis in multiresidue applications. (speaker en curso precongreso)



**Producto 4.** Analysis of complex coffee bean contaminants with high-resolution mass spectrometry. (Entrevista disponible en: The Scientists' Channel)

# Analysis of complex coffee bean contaminants with high-resolution mass spectrometry

**23 Sep 2022**

As a governmental control authority, the Swedish Food Agency has a broad range of methods available for analyzing contaminants in food. However, highly complex contaminant matrices, such as ochratoxin A and acrylamide, are traditionally monitored using single-residue methods. The potential to develop a new, advanced approach that can cover several different contaminants in a single analysis is therefore very appealing. In this expert interview, Susanne Ekroth and Julio Espana discuss their latest project identifying potentially harmful contaminants in coffee, highlighting the existing challenges faced during contaminant analysis, and sharing how they were able to merge a multi-residue method with a single-residue method using innovative technology from Thermo Fisher Scientific.

[View video transcript](#)

Share this video

<https://www.thescientistschannel.com/susanne-ekroth> (2022-10-19)

**Producto 5.** A green-footprint approach for parallel multiclass analysis of contaminants in roasted coffee via LC-HRMS. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Springer. (Aceptada. Borrador en publicación).

Analytical and Bioanalytical Chemistry  
https://doi.org/10.1007/s00216-024-05157-4

RESEARCH PAPER



**A green-footprint approach for parallel multiclass analysis of contaminants in roasted coffee via LC-HRMS**

Julio César España Amórtegui<sup>1</sup> · Susanne Ekroth<sup>2</sup> · Heidi Pekar<sup>2</sup> · Jairo Arturo Guerrero Dallos<sup>1</sup>

Received: 25 September 2023 / Revised: 15 December 2023 / Accepted: 16 January 2024  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH, DE part of Springer Nature 2024

**Abstract**

The development and validation of a simple, comprehensive, and environment-friendly procedure to determine pesticide residues, naturally occurring and processing contaminants in roasted coffee is presented. A solid-liquid extraction of pesticides and mycotoxins with ethyl acetate and the concurrent partition of acrylamide to an aqueous phase follows a parallel analytical strategy that requires a single analytical portion to determine contaminants that are typically analyzed by dedicated single residue methods. The partition rules the lipids out of the aqueous extract before an “in-tube” dispersive solid phase microextraction (dSPME) for acrylamide retention. This is followed by the elution with buffer prior to injection. This extract is independently introduced into the system front end followed by the injection of the compounds from the organic phase, yet all spotted in the same run. A novel liquid chromatography high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) method setup enables the quantification of 186 compounds at 10 µg/kg, 226 at 5 µg/kg, and the acrylamide at 200 µg/kg for a total of 414 molecules, with acceptable recoveries (70–120%) and precision (RSD < 20%) making this strategy significantly faster and cost-effective than the dedicated single residue methods. Even though the presence of chlorpyrifos, acrylamide, and ochratoxin A was confirmed on samples of different origins, the findings were below the limit of quantification. During the storage of raw coffee, no proof of masking of OTA was found; however, condensation with glucose was evidenced during thermal processing experiments with sucrose by using stable isotope labeling (SIL). No detected conjugates were found in roasted nor in commercial sugar-added torrefacto samples, an industrial processing usually carried out above the decomposition temperature of the disaccharide.

**Keywords** Ochratoxin A · Acrylamide · Pesticides · Stable isotope labeling · Validation · Eco-friendly

**Introduction**

*Coffea arabica* (arabica coffee), *C. canephora var. robusta* (robusta coffee), *C. liberica* (liberica coffee), and *C. liberica var. dewevrei* (exelsa coffee) are examples of species of significant importance in the coffee market. Besides, since a universally appreciated taste has built confidence in this everyday beverage key, controls must deal with potential contaminants coming from post-harvest and processing. Mycotoxins are a diverse group of highly toxic secondary metabolic products from various fungal species that could be

considered ubiquitous in the environment. Once mycotoxins infect the field, it may end up in ripened beans [1], then develop during processing stages and resist even harsh conditions such as the coffee roasting [2]. In this regard, small-scale operators must pay attention to programs intended to ensure adherence to good practices to avoid mold formation in the first place [3]. Nevertheless, infestation during storage must be addressed too, since may lead to potential risks out of reach of coffee growers, harnessing an industry built on supreme quality. In fact, recommendations addressed to mitigate these risks may face challenges during the extension of storage conditions in situations such as the pandemic, the global trading crisis, or the rush dynamics of the market, severely hampering exports of coffee [4, 5]. Ochratoxin A (OTA) is the most toxic variant of ochratoxins and represents a serious risk to animal and human health [6]. Even though the most effective way to prevent OTA contamination is to ensure a moisture content of < 12.5% [7, 8], in some regions,

✉ Julio César España Amórtegui  
joespanaa@unal.edu.co

<sup>1</sup> Chemistry Department, Science Faculty, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

<sup>2</sup> Science Department, Swedish Food Agency, Uppsala, Sweden



## Producto 6. Tiered Development of a PAH analysis for Roasted Coffee: A Mini-Method Approach (Poster)

### International Symposium on Food Safety and Control



ID de aportación : 314

Tipo: Poster

## Tiered Development of a PAH analysis for Roasted Coffee: A Mini-Method Approach

A simple and eco-friendly miniaturized method to determine Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in roasted coffee was developed through a stepped fashion. An ultrasound-assisted ethyl acetate (EtOAc) extraction of ground coffee was performed followed by tests of different adsorbents. Graphitized Carbon Black (GBC) showed the best results via Gas Chromatography - Mass Spectrometry in tandem (GC-MS/MS) using stable isotope internal standards (ILIS) for 4 light PAHs. While this strategy provided promising results, its suitability for heavier compounds was questionable due to the high load of co-extractives caused by the strong elution solvent. Alternatively, the EtOAc extract was dried out, redissolved in acetonitrile and analyzed in Liquid Chromatography - High Resolution Mass Spectrometry equipped with Atmospheric Pressure Chemical Ionization (LC-APCI/HRMS). Although the ionization parameters followed optimization for an extended group of 16 PAHs, the high complexity of the raw extract impacted sensitivity due to a strong matrix effect. In the pursuit of a cleaner extract, an alkali transesterification followed by a swift partition delivered acceptable recoveries (70%-120%) and precision (RSD<20%) at 10 ug/kg. A robust method based in the use of GC-MS/MS accomplished high sensitivity and allowed the determination of PAHs residues in multiple samples of different origin with negligible drop in performance.

### Affiliation

Universidad Nacional de Colombia

### Country

Colombia

### Email address

jcespanaa@unal.edu.co

### Confirm that the paper is original and has not been published anywhere else

The paper is original and has not been published anywhere else

### TRAC

Chemical residues and contaminants in food and feed

**Autor primario:** ESPAÑA AMÓRTEGUL, Julio (Universidad Nacional de Colombia)

**Coautor:** GUERRERO, jairo arturo (Universidad Nacional de Colombia)

**Presentador:** ESPAÑA AMÓRTEGUL, Julio (Universidad Nacional de Colombia)



# Bibliografía

1. Daviron B, Ponte S (2005) The coffee paradox: Global markets, commodity trade and the elusive promise of development
2. Ukers W (1935) All about coffee: the tea and coffee trade journal. New York: Burr Printing House
3. FNC (2017) Comportamiento de la industria cafetera colombiana 2017
4. FNC (2018) Región Centro-Sur - Comité de Cafeteros del Tolima
5. FNC (2014) Informe de los Comités Departamentales
6. Bessaire T, Perrin I, Tarres A, Bebius A, Reding F, Theurillat V (2019) Mycotoxins in green coffee: Occurrence and risk assessment. Food Control 96:59–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.08.033>
7. Tozlovanu M, Pfohl-Leszkowicz A (2010) Ochratoxin A in Roasted Coffee from French Supermarkets and Transfer in Coffee Beverages: Comparison of Analysis Methods. Toxins 2:1928–1942. <https://doi.org/10.3390/toxins2081928>
8. FAO, CFC, ICO, ECC (2005) Guidelines for the Prevention of Mould Formation in Coffee
9. ICO (2021) Coffee Development Report 2020, The Value of Coffee: Sustainability, Inclusiveness, and Resilience of the Coffee Global Value Chain
10. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, Groot RJ de, Drosten C, Gulyaeva AA, Haagmans BL, Lauber C, Leontovich AM, Neuman BW, Penzar D, Perlman S, Poon LL, Samborskiy DV, Sidorov IA, Sola I, Ziebuhr J (2020) The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. Nat Microbiol 5:536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
11. Heussner AH, Bingle LE (2015) Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data. Toxins 7:4253–4282. <https://doi.org/10.3390/toxins7104253>

12. ISO (2003) ISO 6673:2003 Green coffee -- Determination of loss in mass at 105 degrees C
13. ITC (2011) The Coffee Exporter's Guide. International Trade Centre (ITC)
14. Oliveros CE, Pabón JP, Trujillo AF, Ramírez CA (2016) Evaluación de prácticas utilizadas en la conservación del café húmedo
15. Commission E (1998) Council Regulation (EEC) No 315/93 of 8 February 1993 laying down Community procedures for contaminants in food. Off J Eur Union
16. Commission E (2014) Commission Regulation (EU) No 696/2014 of 24 June 2014 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of erucic acid in vegetable oils and fats and foods containing vegetable oils and fats . Off J Eur Union 70:12–34
17. Commission E (2010) Commission Regulation (EC) No 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. Off J Eur Union 70:12–34
18. Commission E (2010) Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 . Official Journal of the European Union
19. Commission E (2010) Commission Regulation (EC) No 105/2010 of 5 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A. Off J Eur Union 70:12–34
20. Commission E (2012) Commission Regulation (EC) No 594/2012 of 5 July 2012 amending Regulation (EC) 1881/2006 as regards the maximum levels of the contaminants ochratoxin A, non dioxin-like PCBs and melamine in foodstuffs. Off J Eur Union.  
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1573>
21. Commission E (2023) Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006 (Text with EEA relevance). Off J Eur Union 119:103–157
22. CEN (2009) EN 14132 - Determination of ochratoxin A in barley and roasted coffee - HPLC method with immunoaffinity column clean-up
23. Pittet A, Tornare D, Huggett A, Viani R (1996) Liquid Chromatographic Determination of Ochratoxin A in Pure and Adulterated Soluble Coffee Using an Immunoaffinity Column Cleanup Procedure. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44:3564–3569.  
<https://doi.org/10.1021/jf9602939>
24. EFSA (2014) Scientific Opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. EFSA Journal 12:3916.  
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3916>

25. Freire L, Sant'Ana AS (2018) Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. *Food and Chemical Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.021>
26. Rosén J, Hellenäs K-E (2002) Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst* 127:880–882. <https://doi.org/10.1039/b204938d>
27. Andrzejewski D, Roach JAG, Gay ML, Musser SM (2004) Analysis of Coffee for the Presence of Acrylamide by LC-MS/MS. *J Agr Food Chem* 52:1996–2002. <https://doi.org/10.1021/jf0349634>
28. Commission E (2017) Commission Regulation (EU) 2017/2158 of 20 November 2017 establishing mitigation measures and benchmark levels for the reduction of the presence of acrylamide in food (Text with EEA relevance. ). *Off J Eur Union* 304:24–44
29. (EFSA) EFSA (2008) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food-Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. 6:724
30. Phillips DH (1983) Fifty years of benzo(a)pyrene. *Nature* 303:468–472. <https://doi.org/10.1038/303468a0>
31. DNP (2006) CONPES 3418. Financiación parcial del programa “Fortalecimiento de la calidad del Café de Colombia”
32. Ramírez L, Silva G, Valenzuela L, Villegas A, Villegas L (2006) El café, capital social estratégico. Comisión de Ajuste de la Institucionalidad Cafetera
33. Benavides L (2019) Federación Nacional de Cafeteros anunció que la producción de café se redujo 8,7% en último mes
34. Dupont PN (2018) A Series About the Coffee Paradox | How Do We Turn It Around? <https://coffeecollective.dk/2018/09/coffee-paradox/>. Accessed 23 Apr 2019
35. Wambui C (2018) Kenya's ground-down coffee farmers switch to avocado amid global boom
36. Díaz C (2019) Retirar el café colombiano de la bolsa
37. Quintero L Diseño de buenas prácticas ambientales para los procesos de producción de café especial sostenible, de la vereda la mejora, municipio de Casabianca, Tolima
38. RedList (2014) *Andinobates tolimensis*. The IUCN Red List of Threatened Species
39. DNP (2019) CONPES 3957. Política Nacional de Laboratorios: Prioridades para mejorar el cumplimiento de estándares de calidad

40. Pahlen CM der, Mukherjee K (2019) Climate change and implications for food safety. The First FAO/WHO/AU International Food Safety Conference
41. Gareis M, Bauer J, Thiem J, Plank G, Grabley S, Gedek B (1990) Cleavage of Zearalenone-Glycoside, a “Masked” Mycotoxin, during Digestion in Swine. *J Vet Medicine Ser B* 37:236–240. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1990.tb01052.x>
42. Dall’Erta A, Cirlini M, Dall’Asta M, Rio D, Galaverna G, Dall’Asta C (2013) Masked Mycotoxins Are Efficiently Hydrolyzed by Human Colonic Microbiota Releasing Their Aglycones. *Chemical Research in Toxicology* 26:305–312. <https://doi.org/10.1021/tx300438c>
43. Creswell JW, Creswell DJ (2017) *Research design: Qualitative, quantitative, and mixed methods approaches*. Sage publications
44. Hyland K, Moore I (2020) Highly-sensitive pesticide analysis in baby food. *Sciex Application Note RUO-MKT-02-11958-A*
45. Castaldo L, Graziani G, Gaspari A, Izzo L, Tolosa J, Rodríguez-Carrasco Y, Ritieni A (2019) Target Analysis and Retrospective Screening of Multiple Mycotoxins in Pet Food Using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Toxins* 11:434. <https://doi.org/10.3390/toxins11080434>
46. Narváez A, Rodríguez-Carrasco Y, Castaldo L, Izzo L, Ritieni A (2020) Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Orbitrap High-Resolution Mass Spectrometry for Multi-Residue Analysis of Mycotoxins and Pesticides in Botanical Nutraceuticals. *Toxins* 12:114. <https://doi.org/10.3390/toxins12020114>
47. Houessou JK, Maloug S, Leveque A-S, Delteil C, Heyd B, Camel V (2007) Effect of Roasting Conditions on the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Content in Ground Arabica Coffee and Coffee Brew. *J Agr Food Chem* 55:9719–9726. <https://doi.org/10.1021/jf071745s>
48. Houessou JK, Goujot D, Heyd B, Camel V (2008) Modeling the Formation of Some Polycyclic Aromatic Hydrocarbons During the Roasting of Arabica Coffee Samples. *J Agr Food Chem* 56:3648–3656. <https://doi.org/10.1021/jf073233j>
49. Orecchio S, Ciotti VP, Culotta L (2009) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coffee brew samples: Analytical method by GC–MS, profile, levels and sources. *Food Chem Toxicol* 47:819–826. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.011>
50. Tfouni SAV, Serrate CS, Leme FM, Camargo MCR, Teles CRA, Cipolli KMVAB, Furlani RPZ (2013) Polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee brew: Influence of roasting and brewing procedures in two *Coffea* cultivars. *Lwt - Food Sci Technology* 50:526–530. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.015>
51. Duedahl-Olesen L, Navaratnam MA, Jewula J, Jensen AH (2014) PAH in Some Brands of Tea and Coffee. *Polycycl Aromat Comp* 35:74–90. <https://doi.org/10.1080/10406638.2014.918554>

52. Benson NU, Fred-Ahmadu OH, Olugbuyiro JAO, Anake WU, Adedapo AE, Olajire AA (2018) Concentrations, sources and risk characterisation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in green, herbal and black tea products in Nigeria. *J Food Compos Anal* 66:13–22. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.11.003>
53. Ciecierska M, Derewiaka D, Kowalska J, Majewska E, Drużyńska B, Wołosiak R (2019) Effect of mild roasting on Arabica and Robusta coffee beans contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Food Sci Technology* 56:737–745. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3532-0>
54. Dall’Asta C, Berthiller F (2016) Masked Mycotoxins in Food: Formation, Occurrence and Toxicological Relevance. 189–193. <https://doi.org/10.1039/9781782622574-00189>
55. Berthiller F, Crews C, Dall’Asta C, Saeger S, Haesaert G, Karlovsky P, Oswald IP, Seefelder W, Speijers G, Stroka J (2013) Masked mycotoxins: A review. *Molecular Nutrition & Food Research* 57:165–186. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100764>
56. Bittner A, Cramer B, Humpf H-U (2013) Matrix binding of ochratoxin A during roasting. *Journal of agricultural and food chemistry* 61:12737–43. <https://doi.org/10.1021/jf403984x>
57. Rychlik M, Humpf H-U, Marko D, Dänicke S, Mally A, Berthiller F, Klaffke H, Lorenz N (2014) Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins. *Mycotoxin Research* 30:197–205. <https://doi.org/10.1007/s12550-014-0203-5>
58. Kovač M, Šubarić D, Bulaić M, Kovač T, Šarkanj B (2018) Yesterday masked, today modified; what do mycotoxins bring next? *Archives Industrial Hyg Toxicol* 69:196–214. <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3108>
59. Abdullah S (2015) Efficient searching strategies in PubMed. *Pakistan Oral & Dental Journal* 35:346–350
60. Anders ME, Evans DP (2010) Comparison of PubMed and Google Scholar literature searches. *Respiratory care* 55:578–583
61. Shultz M (2007) Comparing test searches in PubMed and Google Scholar. *J Medical Libr Assoc Jmla* 95:442–445. <https://doi.org/10.3163/1536-5050.95.4.442>
62. Dzuman Z, Zachariasova M, Veprikova Z, Godula M, Hajslova J (2015) Multi-analyte high performance liquid chromatography coupled to high resolution tandem mass spectrometry method for control of pesticide residues, mycotoxins, and pyrrolizidine alkaloids. *Analytica Chimica Acta* 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.021>
63. Freire L, Guerreiro TM, Caramês ETS, Lopes LS, Orlando EA, Pereira GE, Pallone JAL, Catharino RR, Sant’Ana AS (2018) Influence of Maturation Stages in Different Varieties of Wine Grapes ( *Vitis vinifera* ) on the Production of Ochratoxin A and Its

- Modified Forms by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger*. *J Agr Food Chem* 66:8824–8831. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02251>
64. Sueck F, Hemp V, Specht J, Torres O, Cramer B, Humpf H-U (2019) Occurrence of the Ochratoxin A Degradation Product 2'R-Ochratoxin A in Coffee and Other Food: An Update. *Toxins* 11:329. <https://doi.org/10.3390/toxins11060329>
65. Sueck F, Poór M, Faisal Z, Gertzen CG, Cramer B, Lemli B, Kunsági-Máté S, Gohlke H, Humpf H-U (2018) Interaction of Ochratoxin A and Its Thermal Degradation Product 2'R-Ochratoxin A with Human Serum Albumin. *Toxins* 10:256. <https://doi.org/10.3390/toxins10070256>
66. Domínguez I, Arrebola F, Vidal J, Frenich A (2020) Assessment of wastewater pollution by gas chromatography and high resolution Orbitrap mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1619:460964. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460964>
67. Díaz R, Ibáñez M, Sancho JV, Hernández F (2011) Target and non-target screening strategies for organic contaminants, residues and illicit substances in food , environmental and human biological samples by UHPLC-QTOF-MS. *Anal Methods-uk* 4:196–209. <https://doi.org/10.1039/c1ay05385j>
68. Hernández F, Sancho J, Ibáñez M, Abad E, Portolés T, Mattioli L (2012) Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Anal Bioanal Chem* 403:1251–1264. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5844-7>
69. Kaufmann A, Walker S (2012) Post-run target screening strategy for ultra high performance liquid chromatography coupled to Orbitrap based veterinary drug residue analysis in animal urine. *J Chromatogr* 1292:104–10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.019>
70. Wang J, Chow W, Wong JW, Leung D, Chang J, Li M (2019) Non-target data acquisition for target analysis (nDATA) of 845 pesticide residues in fruits and vegetables using UHPLC/ESI Q-Orbitrap. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 411:1421–1431. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01581-z>
71. Tautenhahn R, Patti GJ, Rinehart D, Siuzdak G (2012) XCMS Online: a web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Anal Chem* 84:5035–9. <https://doi.org/10.1021/ac300698c>
72. Sindelar M, Patti GJ (2020) Chemical Discovery in the Era of Metabolomics. *J Am Chem Soc.* <https://doi.org/10.1021/jacs.9b13198>
73. Bueschl C, Kluger B, Berthiller F, Lirk G, Winkler S, Krska R, Schuhmacher R (2012) MetExtract: a new software tool for the automated comprehensive extraction of metabolite-derived LC/MS signals in metabolomics research. *Bioinformatics* 28:736–738. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts012>
74. España JC (2013) Análisis de residuos de plaguicidas en frutas colombianas de exportación y cereales. 0–247

75. Lommen A, Kools HJ (2012) MetAlign 3.0: performance enhancement by efficient use of advances in computer hardware. *Metabolomics* 8:719–726. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0369-1>
76. Kruve A, Kaupmees K (2017) Adduct Formation in ESI/MS by Mobile Phase Additives. *J Am Soc Mass Spectr* 28:887–894. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1626-y>
77. Kruve A, Kaupmees K, Liigand J, Oss M, Leito I (2013) Sodium adduct formation efficiency in ESI source. *J Mass Spectrom* 48:695–702. <https://doi.org/10.1002/jms.3218>
78. DeFelice BC, Mehta S, Samra S, Čajka T, Wancewicz B, Fahrman JF, Fiehn O (2017) Mass Spectral Feature List Optimizer (MS-FLO): A Tool To Minimize False Positive Peak Reports in Untargeted Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (LC-MS) Data Processing. *Analytical chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04372>
79. Fraiser-Vannier O, Chervin J, Cabanac G, Puech-Pages V, Fournier S, Durand V, Amiel A, Andre O, Benamar O, Tsugawa H, Dumas B, Marti G (2020) MS-CleanR: A feature-filtering workflow for untargeted LC-MS based metabolomics. *Anal Chem*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01594>
80. Schymanski EL, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer HP, Hollender J (2014) Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ Sci Technol* 48:2097–2098. <https://doi.org/10.1021/es5002105>
81. Kind T, Fiehn O (2006) Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: Mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. *Bmc Bioinformatics* 7:234. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-234>
82. Kind T, Fiehn O (2007) Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *Bmc Bioinformatics* 8:105. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-105>
83. McNaught AD, Wilkinson A (1997) *Compendium of chemical terminology*. Blackwell Science Oxford
84. Gevaert K, Impens F, Ghesquière B, Damme P, Lambrechts A, Vandekerckhove J (2008) Stable isotopic labeling in proteomics. *Proteomics* 8:4873–85. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800421>
85. Gardiner W, Herrmann J, Mallard W, Owen J (1976) Mechanism of isotope exchange reaction between methane and deuterium. *Int J Chem Kinet* 8:111–122. <https://doi.org/10.1002/kin.550080112>
86. Bueschl C, Krska R, Kluger B, Schuhmacher R (2013) Isotopic labeling-assisted metabolomics using LC–MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405:27–33. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6375-y>

87. Li Z, Zhao C, Cao C (2023) Production and Inhibition of Acrylamide during Coffee Processing: A Literature Review. *Molecules* 28:3476. <https://doi.org/10.3390/molecules28083476>
88. Binello A, Cravotto G, Menzio J, Tagliapietra S (2020) Polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee samples: enquiry into processes and analytical methods. *Food Chem* 344:128631. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128631>
89. Raters M, Matissek R (2014) Quantitation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH4) in Cocoa and Chocolate Samples by an HPLC-FD Method. *J Agric Food Chem* 62:10666–10671. <https://doi.org/10.1021/jf5028729>
90. FSANZ (2008) Survey of chemical contaminants and residues in espresso, instant and ground coffee
91. Sajid M, Płotka-Wasyłka J (2021) Green analytical chemistry metrics: A review. *Talanta* 238:123046. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123046>
92. Mohamed HM, Lamie NT (2016) Analytical Eco-Scale for Assessing the Greenness of a Developed RP-HPLC Method Used for Simultaneous Analysis of Combined Antihypertensive Medications. *J Aoac Int* 99:1260–1265. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0124>
93. Maeztu L, Sanz C, Andueza S, Peña MPD, Bello J, Cid C (2001) Characterization of Espresso Coffee Aroma by Static Headspace GC–MS and Sensory Flavor Profile. *J Agr Food Chem* 49:5437–5444. <https://doi.org/10.1021/jf0107959>
94. López-Galilea I, Fournier N, Cid C, Guichard E (2006) Changes in Headspace Volatile Concentrations of Coffee Brews Caused by the Roasting Process and the Brewing Procedure. *J Agr Food Chem* 54:8560–8566. <https://doi.org/10.1021/jf061178t>
95. Andueza S, Peña MP de, Cid C (2003) Chemical and Sensorial Characteristics of Espresso Coffee As Affected by Grinding and Torrefacto Roast. *J Agr Food Chem* 51:7034–7039. <https://doi.org/10.1021/jf034628f>
96. Maeztu L, Andueza S, Ibañez C, Peña MP de, Bello J, Cid C (2001) Multivariate Methods for Characterization and Classification of Espresso Coffees from Different Botanical Varieties and Types of Roast by Foam, Taste, and Mouthfeel. *J Agr Food Chem* 49:4743–4747. <https://doi.org/10.1021/jf010314l>
97. Barco I, Amórtegui J, Dallos J (2022) Development and validation of qualitative screening, quantitative determination and post-targeted pesticide analysis in tropical fruits and vegetables by LC-HRMS. *Food Chem* 367:130714. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130714>
98. SANTE (2016) Guidance document on identification of mycotoxins in food and feed. SANTE/12089/2016

99. SANTE (2021) Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues and Analysis in Food and Feed. SANTE/11312/2021
100. Omari I, Randhawa P, Randhawa J, Yu J, McIndoe SJ (2019) Structure, Anion, and Solvent Effects on Cation Response in ESI-MS. *J Am Soc Mass Spectr* 30:1750–1757. <https://doi.org/10.1007/s13361-019-02252-0>
101. Wang R, Zhang L, Zhang Z, Tian Y (2016) Comparison of ESI– and APCI–LC–MS/MS methods: A case study of levonorgestrel in human plasma. *J Pharm Analysis* 6:356–362. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2016.03.006>
102. Stadler D, Lambertini F, Bueschl C, Wiesenberger G, Hametner C, Schwartz-Zimmermann H, Hellinger R, Sulyok M, Lemmens M, Schuhmacher R, Suman M, Berthiller F, Krska R (2018) Untargeted LC-MS based <sup>13</sup>C labelling provides a full mass balance of deoxynivalenol and its degradation products formed during baking of crackers, biscuits and bread. *Food Chemistry* 279:303–311. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.150>
103. Takahashi M, Izumi Y, Iwahashi F, Nakayama Y, Iwakoshi M, Nakao M, Yamato S, Fukusaki E, Bamba T (2018) Highly Accurate Detection and Identification Methodology of Xenobiotic Metabolites Using Stable Isotope Labeling, Data Mining Techniques, and Time-Dependent Profiling Based on LC/HRMS/MS. *Analytical Chemistry* 9068–9076. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01388>
104. Xie B, Wang Y, Jones DR, Dey KK, Wang X, Li Y, Cho J-H, Shaw TI, Tan H, Peng J (2018) Isotope Labeling-Assisted Evaluation of Hydrophilic and Hydrophobic Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry for Metabolomics Profiling. *Analytical chemistry* 8538–8545. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01591>
105. Yuan M, Kremer DM, Huang H, Breitkopf SB, Ben-Sahra I, Manning BD, Lyssiotis CA, Asara JM (2019) Ex vivo and in vivo stable isotope labelling of central carbon metabolism and related pathways with analysis by LC-MS/MS. *Nature protocols* 313–330. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0102-x>
106. Jacyna J, Kordalewska M, Markuszewski MJ (2018) Design of Experiments in metabolomics-related studies: An overview. *J Pharmaceut Biomed* 164:598–606. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.11.027>
107. Doppler M, Kluger B, Bueschl C, Schneider C, Krska R, Delcambre S, Hiller K, Lemmens M, Schuhmacher R (2016) Stable Isotope-Assisted Evaluation of Different Extraction Solvents for Untargeted Metabolomics of Plants. *Int J Mol Sci* 17:1017. <https://doi.org/10.3390/ijms17071017>
108. Febrianto NA, Zhu F (2023) Coffee bean processing: Emerging methods and their effects on chemical, biological and sensory properties. *Food Chem* 412:135489. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135489>

109. Bueschl C, Kluger B, Neumann N, Doppler M, Maschietto V, Thallinger GG, Meng-Reiterer J, Krska R, Schuhmacher R (2017) MetExtract II: A software suite for stable isotope assisted untargeted metabolomics. *Analytical Chemistry*.  
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02518>
110. Du P, Kibbe W, Lin S (2006) Improved peak detection in mass spectrum by incorporating continuous wavelet transform-based pattern matching. *Bioinformatics* 22:2059–2065. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl355>
111. Mahieu N, Huang X, Chen Y-J, Patti GJ (2014) Credentialing Features: A Platform to Benchmark and Optimize Untargeted Metabolomic Methods. *Anal Chem* 86:9583–9589.  
<https://doi.org/10.1021/ac503092d>
112. Meng-Reiterer J, Bueschl C, Rechthaler J, Berthiller F, Lemmens M, Schuhmacher R (2016) Metabolism of HT-2 Toxin and T-2 Toxin in Oats. *Toxins* 8:364.  
<https://doi.org/10.3390/toxins8120364>
113. Papalambros PY, Wilde DJ (2000) Principles of optimal design: modeling and computation. Cambridge university press
114. Lawson J, Willden C (2016) Mixture Experiments in R Using mixexp. *Journal of Statistical Software, Code Snippets* 72:1–20. <https://doi.org/10.18637/jss.v072.c02>
115. Lehotay SJ, Maštovská K, Lightfield AR (2005) Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. *J Aoac Int* 88:615–629.  
<https://doi.org/10.1093/jaoac/88.2.615>
116. Lehotay SJ, Son KA, Kwon H, Koesukkiwat 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* 1217:2548–60. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.044>
117. Rejczak T, Tuzimski T (2015) A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chem* 13:. <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0109>
118. Masiá A, Suarez-Varela M, Llopis-Gonzalez A, Picó Y (2016) Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review. *Anal Chim Acta* 936:40–61.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.07.023>
119. Santen JA van, Jacob G, Singh AL, Aniebok V, Balunas MJ, Bunsko D, Neto FC, Castaño-Espriu L, Chang C, Clark TN, Little JLC, Delgadillo DA, Dorrestein PC, Duncan KR, Egan JM, Galey MM, Haeckl FPJ, Hua A, Hughes AH, Iskakova D, Khadiilkar A, Lee J-H, Lee S, LeGrow N, Liu DY, Macho JM, McCaughey CS, Medema MH, Neupane RP, O'Donnell TJ, Paula JS, Sanchez LM, Shaikh AF, Soldatou S, Terlouw BR, Tran TA, Valentine M, Hooff JJJ van der, Vo DA, Wang M, Wilson D, Zink KE, Linington RG (2019) The Natural Products Atlas: An Open Access Knowledge Base for Microbial Natural

Products Discovery. ACS Cent Sci 5:1824–1833.

<https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00806>

120. Açıklın B, Sanlier N (2021) Coffee and its effects on the immune system. Trends Food Sci Technol 114:625–632. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.023>

121. Schrimpe-Rutledge AC, Codreanu SG, Sherrod SD, McLean JA (2016) Untargeted Metabolomics Strategies—Challenges and Emerging Directions. J Am Soc Mass Spectr 27:1897–1905. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1469-y>

122. Fujimoto H, Narita Y, Iwai K, Hanzawa T, Kobayashi T, Kakiuchi M, Arika S, Wu X, Miyake K, Tahara Y, Ikezaki H, Fukunaga T, Toko K (2021) Bitterness compounds in coffee brew measured by analytical instruments and taste sensing system. Food Chem 342:128228. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128228>

123. Gökmen V, Morales F (2014) Encyclopedia of Food Safety. Process Contam 404–408. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-378612-8.00209-2>

124. Ouakhsase A, Fatini N, Addi EA (2021) A facile extraction method followed by UPLC-MS/MS for the analysis of aflatoxins and ochratoxin A in raw coffee beans. Food Addit Contam: Part A 38:1551–1560. <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1925165>

125. Angioni A, Russo M, Rocca CL, Pinto O, Mantovani A (2022) Modified Mycotoxins, a Still Unresolved Issue. Chemistry 4:1498–1514. <https://doi.org/10.3390/chemistry4040099>

126. Ludwig IA, Bravo J, Peña MPD, Cid C (2013) Effect of sugar addition (torrefacto) during roasting process on antioxidant capacity and phenolics of coffee. Lwt - Food Sci Technology 51:553–559. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.12.010>

127. Gomez-Tejedor J (1902) ES28829A1. Un procedimiento mecánico para tostar café. European Patent Office  
<https://worldwide.espacenet.com/patent/search?q=pn%3DES28829A1>

128. Gomez-Tejedor J (1907) ES39494A1. Mejoras en el procedimiento de torrefacción del café con los medios para llevarlo a cabo. European Patent Office  
<https://worldwide.espacenet.com/patent/search?q=pn%3DES39494A1>

129. BOE (2012) Royal Decree 1676/2012, of December 14, which approves the quality standard for coffee

130. CEN (2015) Food analysis. Determination of acrylamide in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). EN 16618:2015.  
<https://doi.org/10.3403/30272429>

131. Breidbach A, Bouten K, Kroeger-Negiota K, Stroka J, Ulberth F (2013) LC-MS based method of analysis for the simultaneous determination of four mycotoxins in cereals and feed

132. Gałuszka A, Migaszewski Z, Namieśnik J (2013) The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends Anal Chem* 50:78–84. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>
133. Maestroni B, Cannavan A (2011) Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed. Part Determining Mycotoxins *Food Feed* 3–36. <https://doi.org/10.1533/9780857090973.1.3>
134. Troise AD, Fiore A, Fogliano V (2014) Quantitation of Acrylamide in Foods by High-Resolution Mass Spectrometry. *J Agr Food Chem* 62:74–79. <https://doi.org/10.1021/jf404205b>
135. Sulyok M, Stadler D, Steiner D, Krska R (2020) Validation of an LC-MS/MS-based dilute-and-shoot approach for the quantification of > 500 mycotoxins and other secondary metabolites in food crops: challenges and solutions. *Anal Bioanal Chem* 412:2607–2620. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02489-9>
136. Wang J, Cai Z, Zhang N, Hu Z, Zhang J, Ying Y, Zhao Y, Feng L, Zhang J, Wu P (2022) A novel single step solid-phase extraction combined with bromine derivatization method for rapid determination of acrylamide in coffee and its products by stable isotope dilution ultra-performance liquid chromatography tandem triple quadrupole electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chem* 388:132977. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132977>
137. Soto L, Fabian N, Garzón DA, Ahumada DA (2020) Development of Reference Material of Mercury in Fish: A comparison of different alternatives to homogeneity assessment
138. Debegnach F, Brera C, Mazzilli G, Sonogo E, Buiarelli F, Ferri F, Rossi P, Collini G, Santis B (2020) Optimization and validation of a LC-HRMS method for aflatoxins determination in urine samples. *Mycotoxin Res* 36:257–266. <https://doi.org/10.1007/s12550-020-00389-6>
139. Wenzl T, Haedrich J, Schaechtele A, Piotr R, Stroka J, Eppe G, Scholl G (2016) Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Food and Feed
140. Sun Q, Dong Y, Wen X, Zhang X, Hou S, Zhao W, Yin D (2023) A review on recent advances in mass spectrometry analysis of harmful contaminants in food. *Front Nutr* 10:1244459. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1244459>
141. Desmarchelier A, Hamel J, Delatour T (2019) Sources of overestimation in the analysis of acrylamide-in coffee by liquid chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr* 1610:460566. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460566>
142. Desmarchelier A, Bebius A, Reding F, Griffin A, Fernandez MA, Beasley J, Clauzier E, Delatour T (2022) Towards a consensus LC-MS/MS method for the determination of acrylamide in food that prevents overestimation due to interferences. *Food Addit Contam Part 1–13*. <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.2022773>

143. Delatour T, Desmarchelier A, Stadler RH (2022) Challenges in the measurement of acrylamide in food by confirmatory methods. *Curr Opin Food Sci* 48:100951. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100951>
144. Merhi A, Kordahi R, Hassan HF (2022) A review on the pesticides in coffee: Usage, health effects, detection, and mitigation. *Frontiers Public Heal* 10:1004570. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1004570>
145. Khaneghah AM, Fakhri Y, Abdi L, Coppa CFSC, Franco LT, Oliveira CAF de (2019) The concentration and prevalence of ochratoxin A in coffee and coffee-based products: A global systematic review, meta-analysis and meta-regression. *Fungal Biol* 123:611–617. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.05.012>
146. Leviet T, Truchement B (1988) ES2003891. Process and apparatus for controlling the roasting degree of torrefacto, especially, coffee. Oficina Española de Patentes y Marcas OEPM [https://consultas2.oepm.es/pdf/ES/0000/000/02/00/38/ES-2003891\\_A6.pdf](https://consultas2.oepm.es/pdf/ES/0000/000/02/00/38/ES-2003891_A6.pdf)
147. Galmiche M, Rodrigues A, Motsch E, Delhomme O, François Y, Millet M (2022) The use of pseudo-MRM for a sensitive and selective detection and quantification of polycyclic aromatic compounds by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 36:e9307. <https://doi.org/10.1002/rcm.9307>
148. Szolar OHJ, Rost H, Braun R, Loibner AP (2002) Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil: Minimizing Sample Pretreatment Using Automated Soxhlet with Ethyl Acetate as Extraction Solvent. *Anal Chem* 74:2379–2385. <https://doi.org/10.1021/ac015739l>
149. Surma M, Sadowska-Rociek A, Cieřlik E (2014) The application of d-SPE in the QuEChERS method for the determination of PAHs in food of animal origin with GC–MS detection. *Eur Food Res Technol* 238:1029–1036. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2181-4>
150. Parveen K, Rafique U (2017) Adsorptive capacity of alumina and cobalt doped alumina hybrid for the removal of polyaromatic hydrocarbons: kinetics and isotherm study. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 12:621–630
151. Mateos R, Oliveira CM, Díez-Pascual AM, Vera-López S, Andrés MPS, Silva RJNB da (2020) Impact of recovery correction or subjecting calibrators to sample preparation on measurement uncertainty: PAH determinations in waters. *Talanta* 207:120274. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120274>
152. Shamsipur M, Hassan J (2010) A novel miniaturized homogenous liquid-liquid solvent extraction-high performance liquid chromatographic-fluorescence method for determination of ultra traces of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment samples. *Journal of chromatography A* 1217:4877–82. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.05.038>

153. Jánská M, Tomaniová M, Hajšlová J, Kocourek V (2006) Optimization of the procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives in fish tissue: Estimation of measurements uncertainty. *Food Addit Contam* 23:309–325. <https://doi.org/10.1080/02652030500401207>
154. Wan Y-C, Kong Z-L, Chao Y-H, Teng C-F, Yang D-J (2022) Optimization of QuEChERS and high performance liquid chromatography-fluorescence detection conditions to assess the impact of preparation procedures on EU priority PAHs in coffee samples and their PAHs consumption risk. *J Food Drug Anal* 30:630–643. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.3436>
155. Jimenez A, Adisa A, Woodham C, Saleh M (2014) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in roasted coffee. *J Environ Sci Heal Part B* 49:828–835. <https://doi.org/10.1080/03601234.2014.938552>
156. Garcia DM, Huang SK, Stansbury WF (1996) Optimization of the atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography mass spectrometry interface. *J Am Soc Mass Spectrom* 7:59–65. [https://doi.org/10.1016/1044-0305\(95\)00620-6](https://doi.org/10.1016/1044-0305(95)00620-6)
157. Paíga P, Silva LMS, Delerue-Matos C (2016) Optimization of the Ion Source-Mass Spectrometry Parameters in Non-Steroidal Anti-Inflammatory and Analgesic Pharmaceuticals Analysis by a Design of Experiments Approach. *J Am Soc Mass Spectrom* 27:1703–1714. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1459-0>
158. Ghislain T, Faure P, Michels R (2012) Detection and Monitoring of PAH and Oxy-PAHs by High Resolution Mass Spectrometry: Comparison of ESI, APCI and APPI Source Detection. *J Am Soc Mass Spectrom* 23:530–536. <https://doi.org/10.1007/s13361-011-0304-8>
159. Houessou JK, Delteil C, Camel V (2006) Investigation of Sample Treatment Steps for the Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Ground Coffee. *J Agric Food Chem* 54:7413–7421. <https://doi.org/10.1021/jf060802z>
160. Akdoğan A, Buttinger G, Wenzl T (2016) Single-laboratory validation of a saponification method for the determination of four polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils by HPLC-fluorescence detection. *Food Addit Contam: Part A* 33:215–224. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1127430>
161. Nguyen LKP, Nguyen NP, Le MT, Bui QM, Cam TS (2023) Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in Vietnamese takeaway coffee: effects of coffee variety, roasting temperature and time. *Food Addit Contam Part ahead-of-print*:1–10. <https://doi.org/10.1080/19440049.2023.2168067>
162. Thiäner JB, Achten C (2017) Liquid chromatography–atmospheric pressure laser ionization–mass spectrometry (LC-APLI-MS) analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons with 6–8 rings in the environment. *Anal Bioanal Chem* 409:1737–1747. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0121-9>
163. Swain M (2012) chemicalize.org. *J Chem Inf Model* 52:613–615. <https://doi.org/10.1021/ci300046g>

164. Fiehn O, Robertson D, Griffin J, Werf M van der, Nikolau B, Morrison N, Sumner LW, Goodacre R, Hardy NW, Taylor C, Fostel J, Kristal B, Kaddurah-Daouk R, Mendes P, Ommen B van, Lindon JC, Sansone S-A (2007) The metabolomics standards initiative (MSI). *Metabolomics* 3:175–178. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0070-6>
165. Pena-Pereira F, Wojnowski W, Tobiszewski M (2020) AGREE – Analytical GREENess Metric Approach and Software. *Anal Chem* 92:10076–10082. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01887>