

Article

Evaluación de la Residualidad de Hymexazol en el cultivo de Fresa (*Fragaria ananassa*) por un método QuEChERS modificado y espectrometría de masas en tándem de cromatografía líquida UPLC-ESI/MS-MS

Manuel Alonzo Báez-Sañudo * , Luis Alfonso Jiménez-Ortega and Pedro de Jesús Bastidas-Bastidas *

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a Eldorado Km. 5.5, Col. Campo El Diez, Culiacán 80110, Sinaloa, Mexico

* Correspondencia: manuel.baez@ciad.mx (M.A.B.S.); pbastidas@ciad.mx (P.J.B.B.).

Resumen: El uso moderado de plaguicidas en la agricultura moderna es de vital importancia para el correcto desempeño y rendimiento de los cultivos. El hymexazole (HYM) es un fungicida de Amplio espectro, comúnmente usado en una gran variedad de cultivos, sin embargo, a la fecha no existen publicaciones sobre su disipación y residualidad en el cultivo de fresa. Por lo que el objective de la investigación fue evaluar la disipación y residualidad del hymexazole en follaje y frutos de fresa mediante un método QuEChERS y UPLC-ESI/MS-MS. Para esto se llevaron a cabo varios experimentos de validación del método cromatográfico, se estableció el cultivo de fresa, recolectó y cuantificó el contenido del plaguicida a través del tiempo para crear los patrones de disipación. El método arrojó buena linealidad, reproducibilidad, precision, repetitibilidad con una recuperación del 73.78 a 109.49 % con un CV del 8.24 %. A pesar de las dos administraciones del HYM en frutos y follaje de fresa no se detectó el compuesto (>0.017 ppm) después de las 24 h de administrado. El HYM por su rápido metabolismo en la planta es capaz de disiparse entre las primeras 24 h posteriores de ser aplicado, por lo que además de su potente efecto fungicida este producto se degrada rápidamente por lo que los residuos en el producto final son mínimos.

Keywords: food safety, pesticide residues, LC/MS, hymexazole, fungicide, dissipation

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname
Lastname

Received: date
Accepted: date
Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

La fresa (*Fragaria × ananassa*) es uno de los cultivos frutales más apreciados por una gran diversidad de consumidores, sus cualidades sensoriales y nutricionales son valoradas ya que es bien sabido que aporta una gran cantidad de vitaminas, minerales y fitoquímicos como ácidos fenólicos y flavonoides los cuales se ha observado poseen actividades antioxidantes [1, 2]. La producción de fresa es liderada por China (3336690 ton), seguido de Estados Unidos (1055963 ton), Egipto (597029 ton) y México (557514 ton) (valores estimados, imputados y oficiales del 2020) [3].

Se estima que la producción de fresa seguirá incrementando debido a la gran diversidad de productos industrializados presentes en el mercado, así mismo a la demanda por alimentos con fitoquímicos benéficos para la salud [4-6], sin embargo, durante la producción primaria el cultivo se vuelve vulnerable a microorganismos fitopatógenos, principalmente a los hongos, los cuales son responsables de la aparición de las principales enfermedades que impactan económicamente al cultivo de fresa, ya que pueden infectar todas las partes de la planta, pudiendo ocasionar severos daños, incluso la muerte, mermando considerablemente su producción. Algunos de los principales agentes fitopatógenos son *Colletotrichum fragariae*, *Sphaerotheca aphansis*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* spp, *Verticillium* spp, *Oidium fragariae*, *Mycosphaerella fragariae* causantes de antracnosis, powdery mildew, gray

mold, leaf scorch, leaf spot, leaf blight, black spot, powdery mildew, Crown rot, entre otras enfermedades [4, 7-9].

Es por ello que el uso moderado y seguro de plaguicidas (antifúngicos) es de vital importancia en la agricultura moderna, esto para mantener la producción y la soberanía alimentaria, ya que estos agroquímicos minimizan las pérdidas pre cosecha y poscosecha. Sin embargo es importante el control, supervisión, monitoreo y cuantificación de estos residuos, ya que las fresas se suelen consumir en fresco o mínimamente procesadas por lo que potencialmente se pueden encontrar presentes, llegando a ocasionar daños a la salud (teratogénicos, mutagénicos y carcinogénicos), así mismo los organismos reguladores de plaguicidas como la Food and Agriculture organization of the United Nations (FAO), Unión Europea (EU) monitorean y estipulan los límites máximos de residuos así como las ingestas diarias aceptables [7, 8, 10]. Durante la producción de fresa es necesario la aplicación de repetidas dosis de fungicidas y otros plaguicidas, por consiguiente, su acumulación puede verse incrementada. La disipación (vida media) de los plaguicidas se refiere al tiempo en el cual el producto es descompuesto a la mitad de su concentración inicial administrada a la planta. Este fenómeno involucra factores como la temperatura, humedad, luz solar, ozono, tipo de plaguicida, cultivo, entre otros [11].

Investigaciones previas mencionan la gran cantidad de plaguicidas usados en el cultivo de la fresa, resaltando su vida media y residualidad. Por ejemplo el kresoxim-methyl, tetraconazole, pyridaben y procymidone, registran una vida media de hasta 14 días [12]. Por otro lado, los patrones de disipación de plaguicidas como el acephate, etofenprox, imidacloprid, indoxacarb, Alpha-cypermethrin, zeta-cypermethrin, fludioxonil and oxytetracycline, usados en el cultivo de coles de Bruselas señalan una residualidad de entre 8.2 a 15.8 días [13]. Patrones de disipación de metaflumizone y acrinathrin aplicados al cultivo de *Aster scaber*, señalan una vida media de 4.5 y 9.2 días, cambiando según el sitio geográfico de cultivo [14]. La vida media reportada del metalaxyl-M y azoxystrobin usados para el control fúngico en el cultivo del scallion, es de 1.15 y 3.89 días respectivamente [15]. En el cultivo del ginseg se emplea el flypyradifurone el cual como productos de descomposición desprende dos metabolitos el difluoroacetic acid y 6-chloronicotinic acid, estos productos presentaron patrones de disipación de 4.5 a 7.9 días [16]. En el cultivo de melón se usa el boscalid y pyraclostrobin, los cuales según los patrones de disipación son 3.52 y 3.27 días, sin embargo, las concentraciones fueron menores a 0.05 mg/kg hasta el día 21 [17]. La degradación del endosulfan en el cultivo de la okra es del 91.5 %, esto durante el séptimo día de evaluación, sin embargo la vida media en las hojas y frutos es de 0.66 y 23.1 días respectivamente [18]. La vida media del thiamethoxam aplicado para el cultivo de durazno es de 4.9-5.5 días, disipándose en un 97.0% en el día 28 de evaluación [19].

El hymexazol (3-hydroxy-5-methylisoxazole) (Figura 1) es un excelente agente antifúngico y regulador del crecimiento usado ampliamente en una gran variedad de cultivos. Resalta por su eficacia, baja toxicidad, y amplio espectro antifúngico principalmente contra *Pythium*, *Phytophthora*, *Aphanomyces* sp., *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Mortierella* sp. and *Rhizoctonia solani* por mencionar algunas. Las aplicaciones pueden ser en las semillas, partes aéreas o por drenching [20]. Fue desarrollado por Sankyo Co., Ltd, Tokyo, Japan, en la década de 1960. El HYM inhibe la germinación de esporas a través de interferir en la biosíntesis del ADN y ARN de los hongos. Cabe mencionar que una vez aplicado es absorbido por las raíces y es metabolizado en dos glicósidos (2-(β -D-glucopyranosyl)-5-methyl-4-isoxazoline-3-one, and 3-(β -D-glucopyranosyl)-5-methylisoxazole), siendo el primero glucosilado en el terminal N y el segundo en el O, ambos confieren características únicas al producto (promotor de crecimiento y antifúngico) [21]. Recientes investigaciones han diseñado hidrogeles supramoleculares cargados de hymexazol mejorando su liberación, absorción y biodegradabilidad [22], así mismo se ha evaluado su adsorción, liberación y características termodinámicas del HYM cargado en diatomite un vehículo eficiente para la liberación de este plaguicida [23]. Así mismo se ha diseñado un proceso de síntesis optimizado permitiendo obtener grandes cantidades de este producto en menor tiempo [24]. Pocos estudios han investigado la residualidad del HYM en frutas y hortalizas [25, 26]. Los métodos cromatográficos (LC) y la preparación con un método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) son los mayormente usados, aceptados internacionalmente y

con mayor número de publicaciones, por lo que son herramientas óptimas para su cuantificación [27-30].

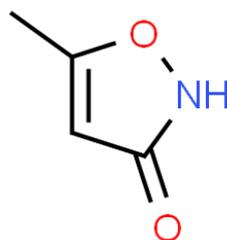


Figure 1. Hymexazol

Se ha investigado ampliamente los patrones de disipación y residualidad de plaguicidas en algunos cultivos, sin embargo, para lo mejor de nuestro conocimiento no se encuentran estudios sobre la disipación y residualidad del HYM en fresa, siendo uno de los fungicidas más exitosos del mercado y un fruto altamente comercializado alrededor del mundo. Por lo que el objetivo de la investigación fue evaluar la residualidad y la disipación del HYM en diferentes dosis aplicadas y tiempos de muestreo en el cultivo de la fresa, usando un método QuEChERS y UPLC/ESI/MS-MS.

2. Materials and Methods

2.1 Reagents and chemicals

Se adquirió acetonitrilo (ACN) grado MS, metanol (MeOH) grado MS, agua milliQ, ACN grado HPLC, ácido acético grado ACS, ácido fórmico grado ACS, formiato de amonio grado ACS, sulfato de magnesio grado reactivo, acetato de sodio grado reactivo, acetato de Amonio grado ACS, cloruro de sodio, Supelclean Envi-carb (Carbon grafitado), Bondesil C18 40 UM, Bondesil PSA 40 UM, filtro de membrana de Nylon de 0.22 μ m, Hymexazol, lote SLBR6983V, pureza 90 % de Sigma Aldrich. Todos los reactivos y disolventes de adquirieron de Sigma Aldrich-Merck (St Louis, MO, USA).

2.2 Field experiments

2.2.1 Establecimiento del cultivo

Se estableció el cultivo de fresa en Bachigualato, Sinaloa, México (24°46'58" Norte y 107°27'30" Oeste. Altitud: 10 msnm) en plantación directa sobre un suelo con textura de aluvión, en camas de 32 m de largo. La plantación fue a doble hilera con una separación de 0.25 m entre plantas y de 1.4 m entre camas.

2.2.2 Treatments and applications

Se aplicaron cuatro tratamientos de HYM en dosis de 0 (testigo), 0.5, 1.0 y 2.0 ml/L de agua con dos réplicas por tratamiento. Cada réplica constó de 80 plantas (n = 160 plantas por tratamiento). En cada tratamiento, se aplicaron 20 mL por planta vía drench penetrando 10 cm la varilla de inyección hasta las raíces. Se realizaron dos aplicaciones de los tratamientos previo al muestreo de follaje y posteriormente otras dos aplicaciones antes del muestreo de fruta. Las fechas de aplicación y de muestreo de follaje y fruta para el análisis de residuos se muestran en el cuadro 1.

Table 1. Aplicación y muestreo de follaje y fruto para el análisis de Hymexazol

Event	Días después del transplante	Actividad
Transplante	0	-
Primera aplicación	35	Aplicación en drench
	48	Aplicación en drench
Segunda aplicación	49	Primer muestreo foliar
	50	Segundo muestreo foliar

Tercera Aplicación	62	Aplicación en drench
	69	Aplicación en drench
Cuarta aplicación	70	Primer muestreo fruto
	71	Segundo muestreo fruto

2.2.2 Sampling

2.2.2.1 Primer monitoreo (foliage)

De cada réplica por tratamiento se tomaron aleatoriamente 100 g de follaje tierno (hojas nuevas) a las 24 y 48 h, después de la segunda aplicación que corresponden a los 49 y 50 días después del trasplante.

2.2.2.2 Segundo monitoreo (Fruits)

De cada réplica por tratamiento se tomaron aleatoriamente 500 g de fruta madura de tamaño uniforme y libre de defectos, esto a las 24 y 48 h, después de la cuarta aplicación que corresponden a los 70 y 71 días después del trasplante. En ambos monitoreos, cada una de las muestras fue transportada en hieleras a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y congeladas a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el análisis.

2.3 Sample preparation

Se usó un método QuEChERS desarrollado por Anastassiades et al. [31] con ligeras modificaciones sugeridas por Jiang et al. [25]. Porciones representativas de 10 g de las muestras descongeladas y re-homogeneizadas fueron pesadas en tubos de plástico para centrifuga de 50 mL. Posteriormente fueron adicionados 10 mL de ACN y sonicados por 10 minutos en baño ultrasónico. Después de la agitación, se agregaron 4.0 g de MgSO_4 y 1.0 g de NaCl y se agitaron vigorosamente por 2 min. Después se centrifugaron por 5 minutos a 5,000 rpm. 2.0 mL del extracto fue transferido a un tubo de centrifuga conteniendo 150 mg de MgSO_4 y 40 mg de carbón grafitado. El tubo fue agitado vigorosamente por 1 min y centrifugado por 5 min a 6,000 rpm. El sobrenadante resultante fue filtrado a través de membrana de nylon de $0.22\text{ }\mu\text{m}$ en un vial de 1.5 mL para el análisis por LC-MS/MS.

2.4 UPLC/MS-MS analysis

Los análisis cromatográficos fueron llevados a cabo en un Sistema UPLC Waters (Waters México) equipado con una bomba cuaternaria clase H (Acquity H), auto muestreador (FTN Acquity). La separación cromatográfica fue realizada en una columna Acquity UPLC BEH Shield RP18, $1.7\text{ }\mu\text{m}$, $2.1 \times 100\text{mm}$ de Waters. La fase móvil fue compuesta por A: (acetato de amonio 7.5 mM + 0.1% de ácido fórmico) y B: (acetonitrilo) bombeados a 0.2 mL/min con el siguiente gradiente (Table 2).

Table 2. Chromatography gradient

Gradient	Time (min)	Flow (mL/min)	A (%)	B (%)
0	Start	0.200	90	10
1	0.7	0.200	80	20
2	3.0	0.200	80	20
3	3.1	0.200	90	10
4	5.0	0.200	90	10

El horno de la columna fue mantenido a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el volumen de inyección fue de $5.0\text{ }\mu\text{L}$. La identificación y cuantificación se realizó mediante sonda ESI+ en un espectrómetro de masas Xevo TQ-S de Waters y estación de trabajo MassLynx. Los iones fueron monitoreados usando MRM (Multiple Reaction Monitoring) para al menos dos transiciones (Figure 2) bajo las siguientes condiciones de tándem MS (Cuadro 3).

Table 3. Conditions of MS/MS

Analyte	Parent m/z	Daughter m/z	Dwell (s)	Cone (V)	Collision (V)
Hymexazol	100.2234	43.9053	0.025	24	12
		53.8855	0.025	24	10

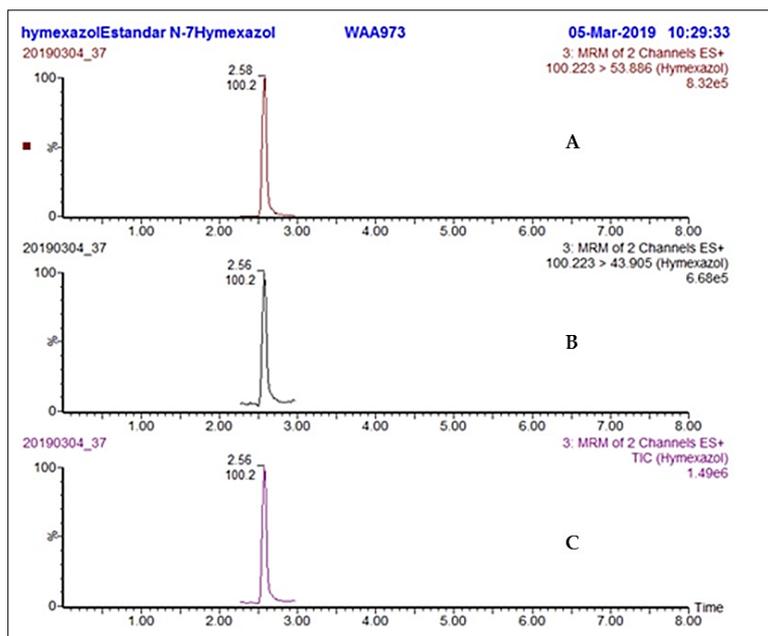


Figure 2. Transiciones de los iones A) parent, B, C) daughters of hymexazol

2.5 Method validation

La validación del método se efectuó estableciendo la precisión y recuperación para HYM a diferentes niveles de fortificación en muestras de fresa, el límite de detección (DL) y límite de cuantificación (QL) se establecieron con la prueba de repetibilidad del nivel más bajo de fortificación. Los datos de recuperación media y valores de porcentaje del coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (DER) se muestran en la Tabla 4. Los recobros para HYM oscilaron entre 72.18 y 108.62 %. La precisión en condiciones de repetibilidad expresado en % CV fue de 8.24 %.

Table 4. Linealidad y % de recobro y precisión del sistema

Analyte	Linealidad		Recobro y precisión intra laboratorio (%)			
	Rango lineal (mg/kg)	Coefficiente de determinación (r ²)	Recuperación (%)	CV (%)	LD (mg/kg)	LQ (mg/kg)
HYM	0.025 – 0.5	0.9995	82.55 ± 6.8	8.24	0.017	0.051

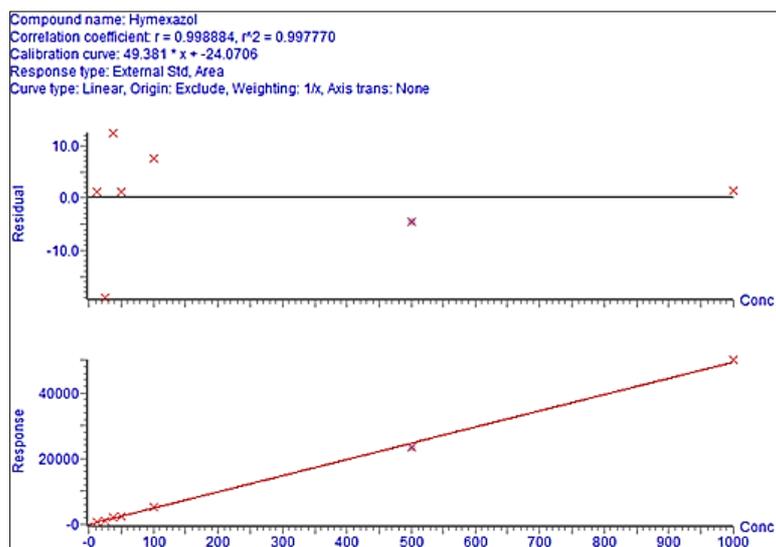


Figure 3. Linearidad del sistema

2.5.1 Análisis de blancos matriz (muestras control)

Muestras de fresas comerciales fueron analizadas por triplicado aplicando el método QuEChERS modificado para demostrar que está libre de residuos de HYM y obtener extracto matriz para la preparación de las diluciones del estándar.

2.5.2 Linearidad del sistema

Se prepararon diluciones del estándar en fase móvil y en extracto matriz, 5 y 6 niveles de concentraciones en los rangos de 0.02557 - 0.5166 y 0.02557 - 1.02312 ng/ μ L.

2.5.3 Linealidad (equipos de detección)

Para establecer el rango lineal del sistema, se prepararon diluciones de HYM con 5 puntos de concentración en los rangos de 0.025 ng/ μ L a 0.5166 ng/ μ L preparados en fase móvil y una curva con 6 niveles en un rango de 0.025 ng/ μ L a 1.0231 ng/ μ L preparados en extracto matriz. Cada nivel de concentración del estándar fue corrido bajo las condiciones de operación establecidas, fueron corridas por triplicado y se obtuvo gráfica de área bajo la curva de concentración teórica contra respuesta de los detectores (conteos de área o de altura), usando Excel 2010 y confirmando con el software de manejo de señal del sistema MassLynx. La linealidad del método se estableció con la fortificación de muestras control en 5 niveles de concentración alto, medio y bajo y graficando el promedio de las cantidades de recobro contra las cantidades de analito agregadas. En ambos casos el criterio de aceptación fue: $r^2 > 0.98$. Además, se observa que el valor de $F_{\text{calculado}}$ (es decir F calculado mediante la función Excel ESTIMACION.LINEAL es mayor que el F_{tablas} ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tablas}}$)), por lo cual se rechaza la hipótesis nula H_0 , siendo la correlación lineal significativa. Otra forma de probar si existe una correlación significativa es a través del estimador t Student para el coeficiente de correlación:

$$tr = |r| \sqrt{(n-2) / (1-r^2)}$$

Dónde:

tr = Valor del estimador t Student obtenido para el coeficiente de correlación

$|r|$ = Valor absoluto del coeficiente de correlación

$n - 2$ = Número de grados de libertad

r^2 = Valor del coeficiente de determinación

Para decir que existe una correlación significativa: La hipótesis nula H_0 es que no existe correlación entre X e Y. Se calculó un valor de t con n-2 grados de libertad y se comparó con el valor tabulado de t para el nivel de confianza requerido ($\alpha = 0.05$), dos-colas, en este caso para un "n" que dependió de los niveles de calibración.

2.5.4 Precisión (Repetibilidad)

Se determinó fortificando muestras control en 5 niveles de concentración (bajo, medio y alto). Se realizaron 6 réplicas del nivel 1 de concentración y 3 réplicas de los niveles restantes, las muestras fueron corridas en réplica simple. Se calculó el porcentaje de recobro (% R) y la precisión en condiciones de repetibilidad. Se evaluó como porcentaje del coeficiente de variación (% CV). El criterio de aceptación para esta prueba fue: % CV \leq 20. Además, la repetibilidad se evaluó mediante el estadístico de Chi cuadrada evaluando la distribución de los resultados de los porcentajes de recobros obtenidos en el método de análisis bajo las mismas condiciones de trabajo. El criterio de aceptación para esta prueba fue:

$$X^2_{calculada} < X^2_{tablas}$$

2.5.5 Exactitud (% R)

Para evaluar este parámetro se tomaron los datos de % R obtenidos en la repetibilidad de cada nivel y se obtuvo el promedio de las recuperaciones de los cinco niveles. El criterio de aceptación para este parámetro fue de: 70 % < % R < 130 %. Los datos obtenidos se evaluaron mediante el parámetro estadístico t de Student que cumplió con que la $t_{calculada}$ se encuentre en el intervalo del valor $\pm t(\alpha/2, n-1)$.

$$t(\alpha/2, n-1) < t_{calculada} < t(1-(\alpha/2), n-1)$$

2.5.6 Precisión intermedia (reproducibilidad)

Se obtuvieron los datos de porcentaje de recobro de dos pruebas de repetibilidad en días distintos con 5 niveles por triplicado del HYM en una matriz de fresa, ambas pruebas cumplieron el criterio de: 70 % < % R < 130 %. El criterio de aceptación para decir que el método fue reproducible fue la prueba estadística F de Fisher es que debe cumplirse que:

$$F_{calculada} < F_{tablas}$$

2.5.7 Límite de detección (DL) y Límite de Cuantificación (QL)

Estos parámetros fueron estimados de los datos de la repetibilidad del primer nivel de fortificación calculando la concentración recuperada y obteniendo la desviación estándar (DE) que se utilizó para estimar los límites de detección (LD) y de cuantificación (LQ) del método como se describe en las ecuaciones (1) y (2) [32].

$$LD = t_{0.99} * DE \dots \dots \dots Ec. (1)$$

$$LC = 3 * LD \dots \dots \dots Ec. (2)$$

LD = $t_{0.99} * DE$ ($t_{0.99} = 3.365$; valor de tablas de t de Student de una cola con 5 grados de libertad (n=6) y 99% de nivel de confianza).

3. Results and Discussion

3.1 Method validation

De acuerdo con el protocolo de verificación y las guías de validación CNRPYC/2017 y US-EPA, 2000 [32, 33], se evaluaron los siguientes parámetros: linealidad y rango lineal de trabajo, límite de cuantificación, límite de detección, precisión en condiciones de repetibilidad, precisión intermedia y exactitud [recuperación de adiciones conocidas (exactitud en matriz)] reportada como sesgo.

3.1.1 Linealidad

La linealidad fue evaluada con 5 y 6 puntos de calibración (0.025 ng/μL a 1.0231 ng/μL) usando mezcla de estándares preparados en extracto matriz y en solvente. En todos los casos, se utilizó la regresión de mínimos cuadrados, trazando la concentración frente al área del pico o en algunos casos el área del pico/área estándar interno. El coeficiente de correlación (R^2) fue superior a 0.98, tal como se observa en la tabla 5 y figura 4.

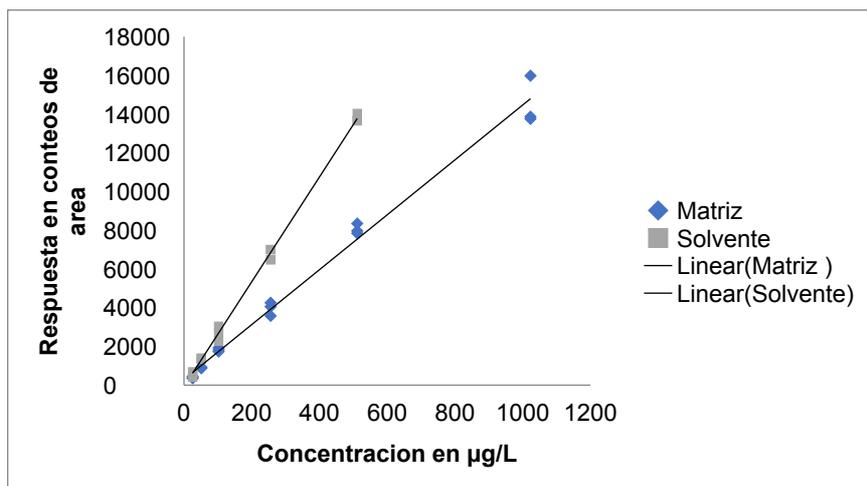


Figure 4. Gráfico de linealidad del sistema

Table 5. Resultados de la estimacion lineal

	Headings?		
b	14.17781	291.93562	a
sb	0.36756	176.76434	sa
r2	0.98936	548.07934	sy/x
F	1487.82482	16.00000	df
SCReg	446929128	4806255.38375	SCR
			es
$F_{tablas} (1,16,0.05) = 3.634$			

Como se observa en la tabla 1, el valor de $F_{calculado}$ (es decir F calculado mediante la función Excel ESTIMACION.LINEAL es mayor que el F_{tablas} ($F_{calculado} > F_{tablas}$), por lo cual se rechaza la hipótesis nula H_0 , demostrando una correlación lineal significativa.

3.1.2 Intervalo lineal de trabajo

Este parámetro fue evaluado mediante la fortificación de muestras control en 5 niveles de concentración alto, medio y bajo, siendo el segundo nivel el LC y en el caso del nivel superior de concentración fue el límite máximo de residuos (LMR) autorizado en Japón. Cada nivel cumplió con la precisión en condiciones de repetibilidad, y veracidad establecidos. Para el experimento se estableció el rango de concentración de 0.025 a 0.5 mg/kg graficando el promedio de las concentraciones de recobro contra la concentración teórica adicionada, obteniendo el coeficiente de correlación (r) y determinación (r^2) superiores a 0.98, tal como se observa en la tabla 6 y figura 5.

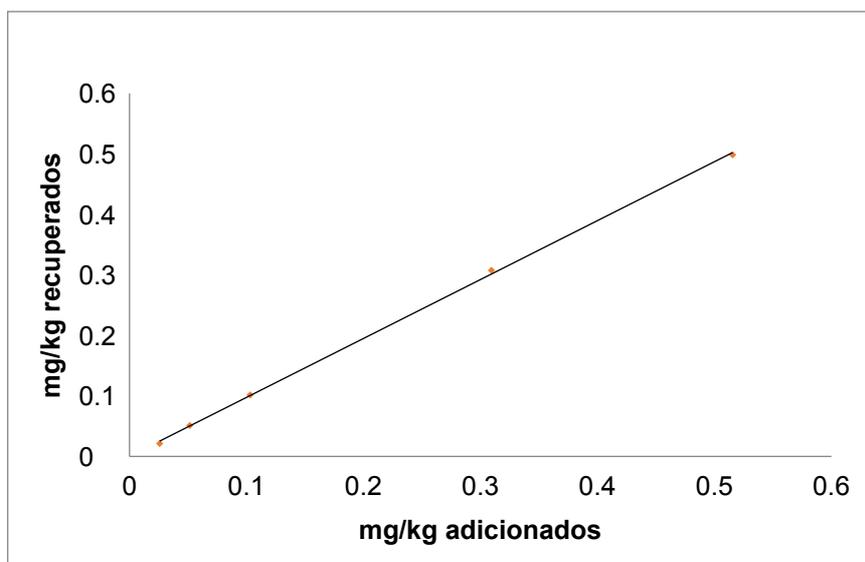


Figura 5. Gráfico de linealidad del método

Tabla 6. Linealidad del método (intervalo lineal de trabajo)

Analyte	Pendiente	R ²	r	Intercepto	Tr _{calculado}	T _{tablas}
HYM	0.97352	0.99958	0.99979	0.00022	84.2468	3.182

Criterio: R2 > 0.98 y tr_{calculado} > t_{tablas}

Entonces como se puede observar en los resultados de la tabla 2, el valor tr_{calculado} es mayor que el t_{tablas}, se rechaza la hipótesis nula Ho, demostrándose una correlación lineal significativa.

3.1.3 Precisión en condiciones de repetibilidad

La precisión fue estimada como desviación estándar relativa o % CV en el nivel bajo de concentración. Tal como se muestra en las tablas 7 y 8 se cumplieron con los criterios de precisión en condiciones de repetibilidad.

Tabla 7. Resultados de precisión en condiciones de repetibilidad

Analitos	% de recobro (R) (n=6)	% CV
HYM	82.55 ± 6.8	8.24

Criterio: CV < 20 %

Tabla 8. Evaluación del estadístico Chi cuadrada para repetibilidad

Identificación	Repetitibilidad				
	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5
A	123.14	89.66	100.91	95.32	107.57
B	72.18	91.97	100.06	92.74	108.81
C	77.42	98.27	101.57	93.97	109.49
Promedio	90.91	93.30	100.85	94.01	108.62
Desviación estándar	28.03	4.45	0.76	1.29	0.98
Desviación estándar ^{^2}	785.542	19.839	0.573	1.662	0.952
Gran media	97.54				
N	15				
n	3				
k	5				
gl	8				
σ²	161.714				

Identificación	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5
A	655.14	62.05	11.39	4.92	100.53
B	642.94	30.99	6.36	22.99	126.98
C	404.72	0.53	16.26	12.73	142.83
SUMA			2241.37		
S ²			149.424		
X ² calculada			12.94		
X ² tablas			15.51		

X² calculada < X² tablas

3.1.4 Precisión Intermedia

La tabla 9 muestra la evaluación de los valores de recobro de cada experimento, donde se demuestra que no existe efecto en los resultados obtenidos en diferente tiempo.

Tabla 9. Resultados de análisis de varianza para un factor con efectos aleatorios.

Reproducibilidad					
	Primera prueba (%R1)	Segunda prueba (%R2)		Primera prueba (%R1)	Segunda prueba (%R2)
N-1 A	88.60484387	82.37213763	N-1 A	128.6743869	150.3599415
N-1 B	106.8859162	73.7810887	N-1 B	48.13027996	434.8552577
N-1 C	103.9409338	82.35901707	N-1 C	15.94098776	150.6818857
N-2 A	89.66218862	99.36175753	N-2 A	105.8044411	22.34911854
N-2 B	91.97229416	96.62788087	N-2 B	63.61694344	3.974475968
N-2 C	98.26803346	101.3885027	N-2 C	2.823353438	45.61963125
N-3 A	104.0634619	95.53686853	N-3 A	16.93441598	0.814680331
N-3 B	103.1838294	98.71074679	N-3 B	10.46853898	16.61764599
N-3 C	104.7404895	101.1419023	N-3 C	22.96491565	42.34925148
N-4 A	95.32211845	98.38129705	N-4 A	21.40171479	14.04019608
N-4 B	92.74434287	98.46564699	N-4 B	51.89724605	14.67943364
N-4 C	93.97162594	101.3833465	N-4 C	35.72083827	45.55000595
N-5 A	107.5661006	96.20050516	N-5 A	58.03062456	2.453086022
N-5 B	108.8080266	95.23711675	N-5 B	78.49445072	0.363421683
N-5 C	109.4905525	98.56626669	N-5 C	91.05425383	15.46058154
Promedio(xj)	99.94831719	94.63427209	Suma	1712.126005	
Gran Media	97.29129464		S _{DM} ²	68.35887195	
S _{EM} ²	211.7930651				
Fcalc	3.098				
Ftablas (1,15,0.05)	4.543				

Fcalculada < Ftablas

3.1.5 Exactitud (%R)

Para evaluar este parámetro se tomaron los datos de %vR obtenidos en las 2 pruebas de repetibilidad y se obtuvo el promedio de las recuperaciones de los cinco niveles de cada prueba. La exactitud del método es del 98 %

Tabla 10. Evaluación de la exactitud del método

Primera prueba (%R1) n=15	Segunda prueba (%R2) n=15
---------------------------	---------------------------

% R (recobro)	99.95	%R (recobro)	94.63
Desv.		Desv.	
Estándar	7.33	Estándar	8.28

Criterio: 70% < %R < 130%

Tabla 11. Evaluación de la exactitud del método

Exactitud			
Identificación	Primera prueba (%R1)	Identificación	Segunda prueba (%R2)
N-1 A	88.60484387	N-1 A	82.37213763
N-1 B	106.8859162	N-1 B	73.7810887
N-1 C	103.9409338	N-1 C	82.35901707
N-2 A	89.66218862	N-2 A	99.36175753
N-2 B	91.97229416	N-2 B	96.62788087
N-2 C	98.26803346	N-2 C	101.3885027
N-3 A	104.0634619	N-3 A	95.53686853
N-3 B	103.1838294	N-3 B	98.71074679
N-3 C	104.7404895	N-3 C	101.1419023
N-4 A	95.32211845	N-4 A	98.38129705
N-4 B	92.74434287	N-4 B	98.46564699
N-4 C	93.97162594	N-4 C	101.3833465
N-5 A	107.5661006	N-5 A	96.20050516
N-5 B	108.8080266	N-5 B	95.23711675
N-5 C	109.4905525	N-5 C	98.56626669
Promedio	99.94831719	Promedio	94.63427209
Desv. Estándar		Desv. Estándar	
CV	7.328795416	CV	8.281513894
IC	7.332585102	IC	8.751072641
IC (u) [-]	3.708814054	IC (u) [-]	4.190947267
IC (u) [+]	96.23950314	IC (u) [+]	90.44332482
	103.6571312		98.82521936
		Exactitud en el intervalo (90.443 -	
n	30	103.657)	
Gran media		97.29129464	
Desv. Estándar total		8.145062117	
Hipótesis u₀		98	
t_{calculada}		-0.477	
t_{tablas} (0.975,29)		±2.045	
-2.045 ≤ t_{calculada} ≤ 2.045			

3.1.6 Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC)

Este parámetro fue estimado mediante el análisis de 6 blancos matriz (fruto fresco) fortificados a 0.0257 mg/kg, donde la desviación estándar (DE) obtenida se utilizó para estimar el LD y LC utilizando las ecuaciones 1 y 2 para t_{0.99} = 3.365; valor de tablas de t de Student de una cola con 5 grados de libertad (n=6) y 99 % de nivel de confianza. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 12. Como se observó en la tabla 7 el LQ establecido fue de 0.05 mg/kg (inferior al LMR de 0.5 mg/kg para fresa establecido en Japón).

Tabla 12. Límite de detección y cuantificación establecidos para el método QuEChERS modificado

Analito	Límite de detección	Límite de Cuantificación (LC)
----------------	----------------------------	--------------------------------------

	(LD) mg/kg	mg/kg
HYM	0.017	0.051

3.2 Dissipation and residuality of hymexazol in foliage and fruits of strawberry

En la tabla 13 se exponen los resultados analíticos del monitoreo de los residuos de HYM en follaje a las 24 y 48 h después de la segunda aplicación.

Tabla 13. Cuantificación de HYM en muestras de follaje de fresa tomadas después de segunda aplicación.

Momento de muestreo	Tratamiento	mg/kg
24 h	Testigo	n.d.
24 h	0.5 mL/L R1	n.d.
24 h	0.5 mL/L R2	n.d.
24 h	1.0 mL/L R1	n.d.
24 h	1.0 mL/L R2	n.d.
24 h	2.0 mL/L R1	n.d.
24 h	2.0 mL/L R2	n.d.
48 h	Testigo	n.d.
48 h	0.5 mL/L R1	n.d.
48 h	0.5 mL/L R2	n.d.
48 h	1.0 mL/L R1	n.d.
48 h	1.0 mL/L R2	n.d.
48 h	2.0 mL/L R1	n.d.
48 h	2.0 mL/L R2	n.d.

n.d.= No detectado (<LD)

En las figuras 6 y 7 se muestran las corridas cromatográficas de las muestras de follaje a las 24 y 48 horas después de aplicar HYM en sus distintas dosis, contrastadas éstas con la corrida del estándar de HYM, demostrando la no detección del mismo.

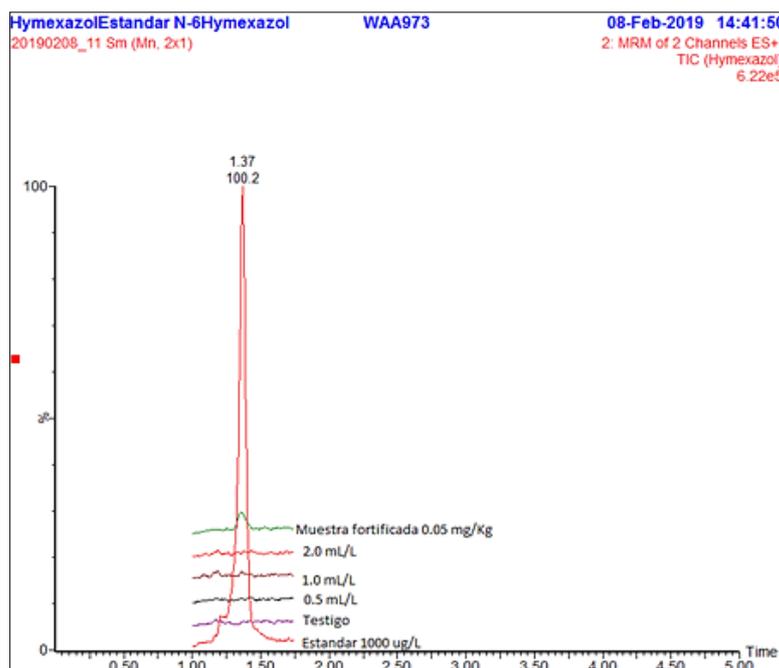


Figura 6. Cromatogramas de muestras de follaje 24 h después de aplicar HYM

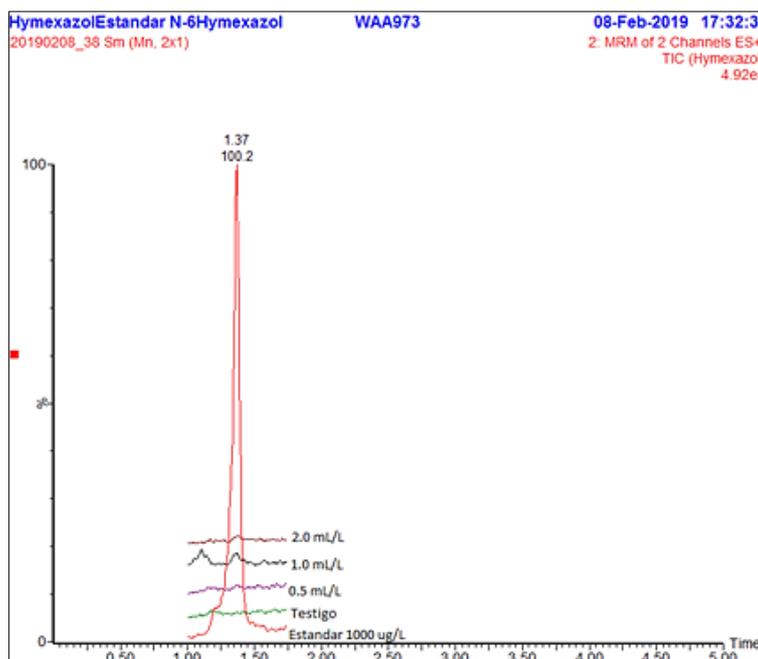


Figura 7. Cromatogramas de muestras de follaje 48 horas después de aplicar HYM

En la tabla 15 se exponen los resultados analíticos del monitoreo de los residuos de HYM en fresa madura a las 24 y 48 h después de la cuarta aplicación.

Tabla 15. Resultados en muestras de frutos de fresa tomadas después de la cuarta aplicación

Identificación	Tratamiento	Analito	mg/kg
24 horas DDA	Testigo	Hymexazol	n.d.
24 horas DDA	0.5 mL/L R1	Hymexazol	n.d.
24 horas DDA	0.5 mL/L R2	Hymexazol	n.d.
24 horas DDA	1.0 mL/L R1	Hymexazol	n.d.
24 horas DDA	1.0 mL/L R2	Hymexazol	n.d.
24 horas DDA	2.0 mL/L R1	Hymexazol	n.d.
24 horas DDA	2.0 mL/L R2	Hymexazol	n.d.
48 horas DDA	Testigo	Hymexazol	n.d.
48 horas DDA	0.5 mL/L R1	Hymexazol	n.d.
48 horas DDA	0.5 mL/L R2	Hymexazol	n.d.
48 horas DDA	1.0 mL/L R1	Hymexazol	n.d.
48 horas DDA	1.0 mL/L R2	Hymexazol	n.d.
48 horas DDA	2.0 mL/L R1	Hymexazol	n.d.
48 horas DDA	2.0 mL/L R2	Hymexazol	n.d.

n.d.= No detectado (<LD)

En las figuras 8 y 9 se muestran las corridas cromatográficas de las muestras de frutos a las 24 y 48 horas después de aplicar HYM en sus distintas dosis, contrastadas con la corrida del estándar de HYM, demostrando la no detección del mismo. Sin embargo, como se muestra en la figura 8 en las muestras tratadas aparece un pico a los 1.73 minutos, el cual no aparece en el testigo, dicho compuesto tiene la misma masa molecular que HYM y arroja las mismas transiciones que el estándar, sin embargo, a diferente tiempo de retención, lo cual nos hace pensar que podría tratarse de su isómero tautomérico (5-metil-3 (2H) –isoxazolone).

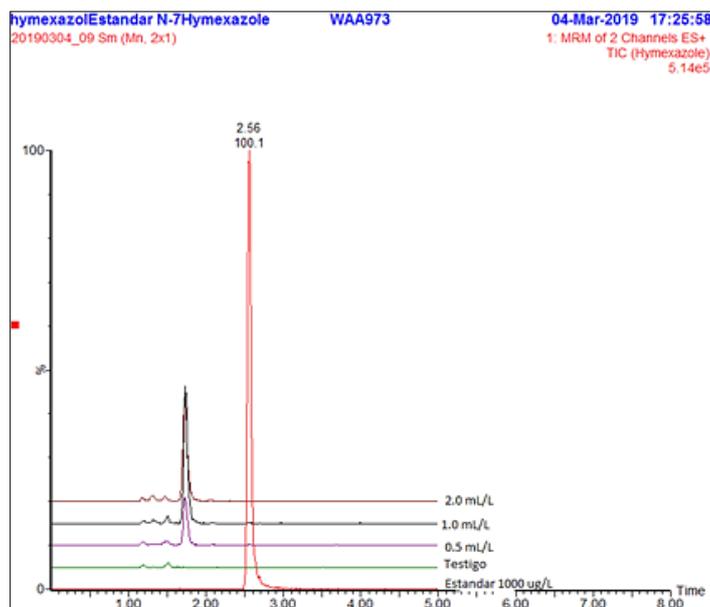


Figura 6. Cromatogramas en muestras de fruto 24 horas DDA

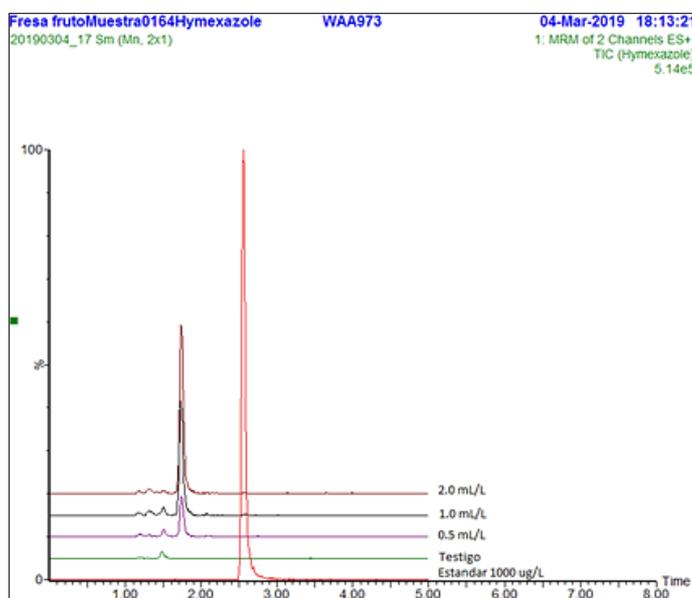


Figura 7. Cromatogramas en muestras de fruto 48 horas DDA

5. Conclusions

Los resultados de la verificación de desempeño del procedimiento QuEChERS modificado, fueron satisfactorios conforme la Guía de Validación CNRPYC/2017, para los parámetros de linealidad, precisión en condiciones de repetibilidad, precisión intermedia, exactitud (% de recobro) y límites de detección y cuantificación. Las recuperaciones variaron en el rango de 73.78 a 109.49 % con CV del 8.24 %. Por tal motivo, el presente estudio concluye que es un procedimiento rápido, simple, sensible y confiable para la determinación de residuos de HYM en productos de origen vegetal utilizando el sistema LC-MS/MS.

El HYM fue identificado por medio de LC-MS/MS. No se detectaron residuos (> 0.017 ppm) de HYM en el follaje de fresa después de dos aplicaciones de tres dosis. No se detectaron residuos (> 0.017 ppm) de HYM en frutos maduros de fresa después de cuatro aplicaciones de tres dosis.

Supplementary Materials:

Author Contributions: Conceptualization, M.A.B.S. and P.J.B.B.; methodology, M.A.B.S. and P.J.B.B.; validation, M.A.B.S. and P.J.B.B.; formal analysis, M.A.B.S. and P.J.B.B.; investigation, M.A.B.S. and P.J.B.B.; resources, M.A.B.S. and P.J.B.B.; data curation, M.A.B.S. P.J.B.B. L.A.J.O.; writing—original draft preparation, M.A.B.S. P.J.B.B. L.A.J.O.; writing—review and editing, M.A.B.S. P.J.B.B. L.A.J.O.; supervision, and project administration, M.A.B.S. and P.J.B.B.; funding acquisition, M.A.B.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding:

Institutional Review Board Statement: Not applicable

Informed Consent Statement: Not applicable

Data Availability Statement: The data are contained within the article

Acknowledgments:

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

References

1. Afrin, S.; Gasparini, M.; Forbes-Hernandez, T. Y.; Reboredo-Rodriguez, P.; Mezzetti, B.; Varela-López, A.; Giampieri, F.; Battino, M., Promising Health Benefits of the Strawberry: A Focus on Clinical Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2016**, *64* (22), 4435-4449.
2. Golovinskaia, O.; Wang, C.-K. Review of Functional and Pharmacological Activities of Berries *Molecules* [Online], 2021.
3. FAO FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>.
4. Agehara, S.; Lin, S.-Y.; Kang, L., Strawberry Production and Markets in Taiwan: Challenges, Trends, and Outlook. *International Journal of Fruit Science* **2020**, *20* (sup3), S2018-S2029.
5. Borrero, J. D.; Zabalo, A. Identification and Analysis of Strawberries' Consumer Opinions on Twitter for Marketing Purposes *Agronomy* [Online], 2021.
6. Hilton, J., Chapter 1 - Growth patterns and emerging opportunities in nutraceutical and functional food categories: market overview. In *Developing New Functional Food and Nutraceutical Products*, Bagchi, D.; Nair, S., Eds. Academic Press: San Diego, 2017; pp 1-28.
7. Wang, H.; Ping, H.; Liu, Q.; Han, P.; Guo, X., Determination of Pesticide Residues in Strawberries by Ultra-performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods* **2022**, *15* (1), 85-95.
8. Sójka, M.; Mszczak, A.; Sikorski, P.; Zagibajło, K.; Karlińska, E.; Kosmala, M., Pesticide residue levels in strawberry processing by-products that are rich in ellagitannins and an assessment of their dietary risk to consumers. *NFS Journal* **2015**, *1*, 31-37.
9. Petrasch, S.; Knapp, S. J.; van Kan, J. A. L.; Blanco-Ulate, B., Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. **2019**, *20* (6), 877-892.
10. Chu, Y.; Tong, Z.; Dong, X.; Sun, M.; Gao, T.; Duan, J.; Wang, M., Simultaneous determination of 98 pesticide residues in strawberries using UPLC-MS/MS and GC-MS/MS. *Microchemical Journal* **2020**, *156*, 104975.
11. Shen, Y.; Zhao, E.; Zhang, W.; Baccarelli, A. A.; Gao, F., Predicting pesticide dissipation half-life intervals in plants with machine learning models. *Journal of Hazardous Materials* **2022**, *436*, 129177.
12. Song, L.; Zhong, Z.; Han, Y.; Zheng, Q.; Qin, Y.; Wu, Q.; He, X.; Pan, C., Dissipation of sixteen pesticide residues from various applications of commercial formulations on strawberry and their risk assessment under greenhouse conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2020**, *188*, 109842.
13. An, D.; Ko, R.; Kim, J.; Kang, S.; Lee, K.; Lee, J., Dissipation behavior and dietary exposure risk of pesticides in Brussels sprout evaluated using LC-MS/MS. *Scientific Reports* **2022**, *12* (1), 12726.
14. Lee, S.; Ko, R.; Lee, K.; Kim, J.; Kang, S.; Lee, J., Dissipation patterns of acrinathrin and metaflumizone in *Aster scaber*. *Applied Biological Chemistry* **2022**, *65* (1), 14.
15. Chai, Y.; Liu, R.; Du, X.; Yuan, L. Dissipation and Residue of Metalaxyl-M and Azoxystrobin in Scallions and Cumulative Risk Assessment of Dietary Exposure to Hepatotoxicity *Molecules* [Online], 2022.
16. Fang, N.; Zhang, C.; Lu, Z.; Lu, Z.; Zhang, Z.; Wang, B.; Hou, Z.; Zhao, X. Dissipation, Processing Factors and Dietary Risk Assessment for Flupyradifurone Residues in Ginseng *Molecules* [Online], 2022.
17. Lv, L.; Su, Y.; Dong, B.; Lu, W.; Hu, J.; Liu, X. Dissipation Residue Behaviors and Dietary Risk Assessment of Boscalid and Pyraclostrobin in Watermelon by HPLC-MS/MS *Molecules* [Online], 2022.
18. Nath, R.; Komala, G.; Fantke, P.; Mukherjee, S., Dissipation kinetics, residue modeling and human intake of endosulfan applied to okra (*Abelmoschus esculentus*). *Science of The Total Environment* **2022**, *835*, 155591.
19. Tian, F.; Qiao, C.; Wang, C.; Pang, T.; Guo, L.; Li, J.; Pang, R.; Xie, H., The fate of thiamethoxam and its main metabolite clothianidin in peaches and the wine-making process. *Food Chemistry* **2022**, *382*, 132291.
20. Fan, Y.; Miao, W.; Lai, K.; Huang, W.; Song, R.; Li, Q. X., Developmental toxicity and inhibition of the fungicide hymexazol to melanin biosynthesis in zebrafish embryos. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **2018**, *147*, 139-144.
21. Gao, K.; Qin, Y.; Wang, L.; Li, X.; Liu, S.; Xing, R.; Yu, H.; Chen, X.; Li, P., Design, Synthesis, and Antifungal Activities of Hymexazol Glycosides Based on a Biomimetic Strategy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2022**, *70* (30), 9520-9535.
22. Xu, C.; Cao, L.; Cao, C.; Chen, H.; Zhang, H.; Li, Y.; Huang, Q., Fungicide itself as a trigger to facilely construct Hymexazol-Encapsulated polysaccharide supramolecular hydrogels with controllable rheological properties and reduced environmental risks. *Chemical Engineering Journal* **2023**, *452*.
23. Liu, Y.; Zhang, J.; Sheng, X.; Li, N.; Ping, Q., Adsorption and Release Kinetics, Equilibrium, and Thermodynamic Studies of Hymexazol onto Diatomite. *ACS Omega* **2020**, *5* (45), 29504-29512.
24. Ma, X.-p.; Chen, J.-s.; Du, X.-h., A Continuous Flow Process for the Synthesis of Hymexazol. *Organic Process Research & Development* **2019**, *23* (6), 1152-1158.
25. Jiang, Z.; Li, H.; Cao, X.; Du, P.; Shao, H.; Jin, F.; Jin, M.; Wang, J., Determination of hymexazol in 26 foods of plant origin by modified QuEChERS method and liquid chromatography tandem-mass spectrometry. *Food Chemistry* **2017**, *228*, 411-419.
26. Sun, D.; Li, L.; Ji, R.; Li, W.; Ye, H.; Wu, Y.; Liu, C., Determination of hymexazol in cucumber and soil samples by derivatization using GC-FPD. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **2011**, *87* (6), 653-656.

27. Orazbayeva, D.; Muratuly, A.; Bektassov, M.; Zhakupbekova, A.; Kenessov, B., Chromatographic determination of pesticides in soil: Current trends in analysis and sample preparation. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* **2022**, *35*, e00174.
28. González-Curbelo, M. Á.; Varela-Martínez, D. A.; Riaño-Herrera, D. A. Pesticide-Residue Analysis in Soils by the QuEChERS Method: A Review *Molecules* [Online], 2022.
29. Syrgabek, Y.; Alimzhanova, M. Modern Analytical Methods for the Analysis of Pesticides in Grapes: A Review *Foods* [Online], 2022.
30. Wahab, S.; Muzammil, K.; Nasir, N.; Khan, M. S.; Ahmad, M. F.; Khalid, M.; Ahmad, W.; Dawria, A.; Reddy, L. K.; Busayli, A. M. Advancement and New Trends in Analysis of Pesticide Residues in Food: A Comprehensive Review *Plants* [Online], 2022.
31. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F. J., Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* **2003**, *86* (2), 412-431.
32. EPA, ASSIGNING VALUES TO NONDETECTED/NON-QUANTIFIED PESTICIDE RESIDUES IN HUMAN HEALTH FOOD EXPOSURE ASSESSMENTS. 2000.
33. SAGARPA, S., Guía de validación de métodos para el análisis de residuos de plaguicidas en productos vegetales por espectrometría de masas/masas CNRPyC/2017 GVM/Rev01 Implementado el 30/05/2017. 2017.