



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA
MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
QUÍMICA**

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
MÓDULO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

**DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN ALIMENTOS
MEDIANTE LA TÉCNICA DE CROMATOGRFÍA DE
GASES**

Autora: Ana Rodrigo Fernández

Tutora: Rosa M^a Garcinuño Martínez

**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
Septiembre 2018**

GLOSARIO DE TÉRMINOS

A_i	Área de pico absoluta
A_{TPP}	Área normalizada a TPP
ASE	Extracción acelerada por disolvente
B	Sector magnético
BPA	Buenas Prácticas Agrícolas
CI	Ionización química
CS	Chitosán
DB-5	5-fenil-metilpolisiloxano
DI	Inmersión directa
DL₅₀	Dosis requerida para matar al 50% de la población objeto de estudio (dosis letal mínima)
DPX	Extracción con pipeta desechable
DPX-RP	Extracción con pipeta desechable de fase inversa
DSPE	Extracción en fase sólida dispersiva
ECD	Detector de captura electrónica
μ-ECD	Microdetector de captura electrónica
E	Sector eléctrico
EI	Impacto electrónico
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FID	Detector de ionización de llama
FPD	Detector fotométrico de llama
FTIR	Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier
GC	Cromatografía de gases
GCxGC	Cromatografía de gases multidimensional
GC/FPD	Cromatografía de gases acoplada a detector fotométrico de llama
GC/PFPD	Cromatografía de gases acoplada a detector fotométrico de llama pulsada
GC-qMS	Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas con analizador de cuadrupolo
GC/XSD	Cromatografía de gases acoplada a sistema de detección específico de halógeno
GC-MS	Cromatografía de gases-Espectrometría de masas
GC-MS/MS	Cromatografía de gases-Espectrometría de masas en tándem
GPC	Cromatografía de permeación en gel
HPT	Heptacloro
HS	Espacio de cabeza
IT	Trampa de iones

LCL	Nivel más bajo de calibración
LLE	Extracción líquido-líquido
LMR	Límite máximo de residuos
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LP-GC/MS	Cromatografía de gases rápida de baja presión acoplada a espectrometría de masas
LVI	Inyección de gran volumen
MAE	Extracción asistida por microondas
MeCN	Acetonitrilo
MP	Protección de membrana
MS	Espectrometría de masas
MSPD	Dispersión de la matriz en fase sólida
NCI	Ionización química negativa
NPD	Detector de nitrógeno-fósforo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Muestras Paralelas
PI	Patrón interno
PSA	Amina primaria-secundaria
PTV	Vaporización con temperatura programada
Q	Cuadrupolo
RSD	Desviación estándar relativa
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SFE	Extracción con fluidos supercríticos
SIM	Monitorización de iones seleccionados
S/N	Señal/ruido
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
TOF	Tiempo de vuelo
TPP	Trifenilfosfato

ÍNDICE

1. Problemática existente y Objetivos.....	1
2. Introducción.....	3
2. 1. Definición, clasificación y propiedades de los pesticidas.....	3
2. 2. Utilización de los pesticidas en la agricultura actual.....	6
2. 3. Legislación aplicable.....	7
3. Pretratamiento de las muestras.....	9
3. 1. Métodos de extracción.....	9
3. 1. 1. Extracción líquido-líquido (LLE).....	9
3. 1. 2. Extracción en fase sólida (SPE).....	9
3. 1. 2. 1. Microextracción en fase sólida (SPME).....	9
3. 1. 2. 2. Dispersión de matriz en fase sólida (MSPD).....	10
3. 1. 3. Extracción con fluidos supercríticos (SFE).....	10
3. 1. 4. Extracción asistida por microondas (MAE).....	10
3. 1. 5. QuEChERS.....	10
3. 2. Purificación o limpieza de los extractos.....	11
4. Cromatografía de gases.....	11
4. 1. Principio o fundamento teórico.....	11
4. 2. Sistemas de detección.....	12
4. 2. 1. Principales detectores utilizados.....	12
4. 2. 2. Espectrometría de masas como sistema de detección.....	13
4. 3. Cromatografía de gases multidimensional (GCxGC).....	13
5. Determinación de pesticidas organofosforados en frutas mediante cromatografía de gases.....	14
6. Tabla resumen de los métodos analíticos comentados.....	54
7. Conclusiones.....	56
8. Referencias bibliográficas.....	57

1. PROBLEMÁTICA EXISTENTE Y OBJETIVOS.

Las prácticas agropecuarias actuales comprenden un uso abusivo e incontrolado de pesticidas debido a su capacidad para controlar plagas, enfermedades y malas hierbas que disminuirían la producción de los cultivos y la calidad de las cosechas.

Sin embargo, la persistencia y distribución medioambiental de los pesticidas origina contaminación de las aguas, los suelos y los alimentos, por lo que su utilización presenta ciertos problemas tanto medioambientales como para la salud de los seres vivos.

Dentro del amplio grupo de pesticidas existentes, en este trabajo nos centraremos en los pesticidas organofosforados, que son los más utilizados en la actualidad gracias a su moderada persistencia en el medio ambiente, su elevada eficacia y su extenso campo de aplicación.

Estudiaremos la presencia de estos pesticidas en frutas, ya que constituyen uno de los grupos de alimentos que más sufre el uso de este tipo de compuestos. Además, en la actualidad, se trata de productos cada vez más demandados por los consumidores, gracias a la preocupación por llevar hábitos de vida y alimentación más saludables.

El interés y la preocupación social por la seguridad alimentaria va en aumento, y la presencia de pesticidas en alimentos representa un riesgo potencial para la salud, debido a los efectos adversos que provoca una exposición prolongada a estos compuestos tóxicos.

Es por ello que existen diversas normativas europeas que establecen límites máximos de residuos (LMR) tolerables de los pesticidas en diferentes matrices, y promueven el monitoreo y el control efectivo de dichos compuestos para garantizar la calidad y la seguridad de los alimentos.

Las exigencias al respecto son cada vez mayores, por lo que requieren la utilización de técnicas y metodologías analíticas capaces de ser empleadas en análisis de rutina para extraer, separar, identificar y cuantificar los compuestos.

Además, considerando los bajos niveles establecidos como LMRs de los pesticidas en alimentos debido a las estrictas normativas, es importante que los métodos analíticos empleados sean lo suficientemente sensibles y selectivos. Esto es particularmente importante en el análisis multiresiduo, en el que han de determinarse simultáneamente un número elevado de pesticidas.

También poseen una elevada importancia los métodos de extracción y purificación de los pesticidas en los diferentes alimentos, cuya principal función es la de maximizar la recuperación de los analitos y minimizar las interferencias.

Los métodos de extracción utilizados en la bibliografía existente son muy numerosos, siendo los más frecuentes la extracción líquido-líquido (LLE), el método QuEChERS ("rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro", denominado así por sus siglas en inglés), la extracción con fluidos supercríticos (SFE), la extracción asistida por microondas (MAE), la extracción en fase sólida (SPE), la microextracción en fase sólida (SPME) y la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD).

Por otra parte, los métodos analíticos descritos en la literatura disponible para estas determinaciones incluyen generalmente métodos cromatográficos.

En este trabajo, nos centraremos en la cromatografía de gases (GC) acoplada a cualquier tipo de detector universal o selectivo, tales como el detector de ionización de llama (FID), el de captura electrónica (ECD), el detector fotométrico de llama (FPD), el de nitrógeno-fósforo (NPD), o el acoplamiento de la cromatografía de gases a la espectrometría de masas (GC-MS).

Por todo lo expuesto, el objetivo general de este trabajo es la realización de una exhaustiva revisión bibliográfica de los métodos analíticos empleados en la determinación de pesticidas organofosforados en frutas utilizando la técnica analítica de cromatografía de gases, predominante en este tipo de determinaciones.

Para la consecución de dicho objetivo principal, se establecen los siguientes objetivos específicos:

- Profundizar en la problemática que presenta la determinación de pesticidas organofosforados en las matrices objeto de estudio.
- Realizar un estudio comparativo de los diferentes métodos de extracción utilizados, incluidos en las etapas de pretratamiento de muestras, mediante la evaluación de parámetros tales como los porcentajes de recuperación obtenidos con los mismos.
- Realizar un estudio comparativo de las metodologías derivadas de la técnica analítica de cromatografía de gases, evaluando diferentes parámetros o propiedades analíticas, tales como la precisión (repetibilidad y reproducibilidad), el límite de detección, el límite de cuantificación, el tiempo de análisis, el consumo de disolventes, etc.
- Establecer el riesgo potencial que pueden presentar ciertos alimentos como las frutas, teniendo en cuenta la concentración que presentan de pesticidas organofosforados y los límites máximos de residuos tolerables establecidos para los mismos.

2. INTRODUCCIÓN.

2. 1. DEFINICIÓN, CLASIFICACIÓN Y PROPIEDADES DE LOS PESTICIDAS.

Según el *Codex Alimentarius*, elaborado por la *Organización Mundial de la Salud* (OMS) y la *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura* (FAO), se denomina *pesticida* o *plaguicida* a cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinada a impedir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o piensos, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos.

El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte. El término excluye normalmente los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios y medicamentos veterinarios (OMS, FAO, 2010).

Además, los pesticidas pueden transformarse en el medioambiente en una gran cantidad de productos de degradación, que a veces pueden ser tan tóxicos y persistentes como los pesticidas de los que proceden (Tang et al, 2014). Así, se define *residuo de pesticida* como cualquier residuo o sustancia, incluidas las sustancias activas, los metabolitos y los productos de degradación o de reacción de sustancias activas utilizadas actualmente o con anterioridad en productos fitosanitarios (Reglamento CE Nº 396/2005).

Los pesticidas pueden clasificarse según su composición química, el tipo de organismo que controlan, el nivel de toxicidad aguda, la persistencia en el medio ambiente, etc.

• **Según la composición química**, los pesticidas se clasifican principalmente en:

○ **Organofosforados**: Pertenecen a este grupo los pesticidas con estructura química derivada del ácido fosfórico. Sus propiedades fisicoquímicas (solubilidad en agua, presión de vapor, peso molecular, estabilidad térmica, etc.), así como su capacidad de penetración y distribución varían en función de su estructura (Jaramillo-Colorado et al, 2016).

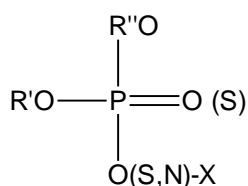


Figura 1. Estructura general de los pesticidas organofosforados.

Los pesticidas organofosforados se descomponen con mayor facilidad y, por tanto, son menos persistentes en el ambiente que otros tipos de pesticidas, aunque presentan de igual forma una alta toxicidad.

Se trata del grupo de pesticidas más utilizado en la actualidad para el control de plagas, junto con los organoclorados (Gutiérrez et al, 2010). Presentan una absorción rápida por las vías respiratorias, la piel, y mediante la ingestión.

Actúan generalmente como inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, modificando la señal colinérgica al inactivar al neurotransmisor acetilcolina, de forma que su principal efecto tóxico es la alteración del sistema nervioso (Plenge-Techellea et al, 2007).

Destacan el clorpirifós, el diazinón, el profenofos, el malatión, el etión y el paratión-metilo.

- **Organoclorados:**

Se trata de pesticidas caracterizados por poseer una estructura cíclica y átomos de cloro. Presentan bajo coste, estabilidad química y bioquímica, y amplio espectro, siendo su persistencia de moderada a alta. Son solubles en compuestos orgánicos de baja polaridad (liposolubles). Por ello, se acumulan en el tejido graso y se metabolizan lentamente.

Algunos alteran el sistema endocrino, pues imitan, incrementan o inhiben la acción de las hormonas. Pueden dañar la salud reproductiva o promover el desarrollo de carcinomas. Por ello, fueron prohibidos y sustituidos por los organofosforados (Pérez et al, 2009).

El DDT, el endosulfán, el aldrín, el dieldrín o el endrín son algunos de los más conocidos.

- **Carbamatos:**

Los carbamatos tienen como estructura base la de un éster N-sustituido del ácido carbámico, NH_2COOH , dependiendo su toxicidad de la longitud de las cadenas laterales.

Se consideran menos tóxicos que los pesticidas organofosforados, y se absorben rápidamente a través de la piel, los pulmones, el tracto gastrointestinal y las mucosas, y actúan también como inhibidores de la acetilcolinesterasa.

Destacan los N-metilcarbamatos debido a su efectividad y su baja bioacumulación (Valencia y Guerrero, 2008). El carbofurán, el aldicarb, el carbaril y el metiocarb son carbamatos.

- **Piretroides:**

Pesticidas derivados de las *piretrinas*, constituyentes del *pelitre*, derivado vegetal utilizado a menudo como insecticida (Chandra et al, 2014).

Destaca su escasa estabilidad y su alta capacidad de degradarse fácilmente en el suelo, además de no presentar grandes efectos tóxicos sobre la salud humana.

El cipermetrín, el deltametrín, el bifentrín o el permetrín pertenecen a este grupo.

- **En función del tipo de organismo que controlan,** los pesticidas se clasifican en:

- **Insecticidas:** Compuestos utilizados para eliminar insectos presentes en los cultivos en cualquiera de sus etapas de desarrollo (Albero et al, 2009).

Los más abundantes son los organoclorados, prohibidos actualmente en muchos países debido a su alta persistencia en el medio ambiente y potencial toxicidad carcinógena. Destacan el γ -HCH, el p,p'-DDT y el endosulfán. Dentro de los organofosforados, destacan el paratión, el malatión y el clorfenvinfos. Por su parte, los carbamatos más conocidos son el carbaril, el carbofurano y el aldicarb y, dentro de los piretroides, destaca el acrinatrín.

- **Herbicidas:**

Pesticidas cuya principal función es el control de las malas hierbas, que al competir con los cultivos por los nutrientes, pueden afectar a su desarrollo, dificultar las labores agrícolas o ser foco de enfermedades que puedan pasar a los cultivos.

Los herbicidas se aplican antes o después de sembrar, y pueden ser de preemergencia si el cultivo no ha emergido o de postemergencia, cuando el cultivo ya se ha desarrollado.

Se diferencian según su acción *total*, si destruyen toda la vegetación, o *selectiva*, siendo los más utilizados, ya que atacan únicamente las malas hierbas sin afectar a los cultivos.

Se clasifican según su estructura química, que define su actuación sobre el metabolismo de las plantas, en triazinas, fenoxiácidos, dinitroanilinas, carbamatos y ureas, principalmente.

Los más conocidos son la atrazina, el clorprofam, el alacloro, el bensulfuron, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético o el glifosfato, el más conocido, absorbido en cantidades mayores en suelos orgánicos, siendo su lixiviación más elevada en suelos minerales (Pérez et al, 2013).

- **Fungicidas:**

Los fungicidas son pesticidas que se utilizan para el control de enfermedades provocadas por los hongos en campo (en semillas, frutos y plantas), y para la protección durante el transporte, el almacenamiento y la comercialización de alimentos.

Pueden ser orgánicos (organoclorados, organomercuriales, ditiocarbamatos, tiazoles, etc.) e inorgánicos (sulfuros, sales de cobre, sales de mercurio, etc.) (Gilbert et al, 2010).

Los fungicidas más conocidos son el ziram, el tirad, el tiabendazol, o la anilazina.

- **Rodenticidas:** Pesticidas utilizados para el control de roedores. Generalmente, inhiben la producción de la protrombina y la trombina, por lo que son anticoagulantes (como la warfarina y la bromodiona, derivados de la cumarina; o la clorofacinona).

Pueden ser también orgánicos de tipo organoclorado u organofosforado e inorgánicos como el fósforo amarillo y el fosforo de zinc, entre otros (Albero et al, 2009).

- **Acaricidas:**

Estos pesticidas se dedican al control de los ácaros y pueden dividirse en dos grupos: los que actúan exclusivamente como acaricidas, y los que tienen también función insecticida (como algunos compuestos organofosforados y carbamatos).

Abamectina, acetamiprid y moxidectina son algunos ejemplos de acaricidas.

- **En función de su toxicidad aguda**, estudiada en ratones y expresada como DL₅₀ (dosis requerida para matar al 50% de la población objeto de estudio), la OMS clasifica a los pesticidas dentro de cuatro categorías: *extremadamente tóxicos* (aldicarb, paratión, hexaclorobenceno), *altamente tóxicos* (carbofuran, tiofanox, warfarina, fluoroacetamida, etc.), *moderadamente tóxicos* (como el endosulfán, el isoproturón, o el paraquat) y

ligeramente tóxicos, grupo al que pertenecen pesticidas como la atrazina o el etridiazol.

• **Según la persistencia en el medio ambiente.** Los pesticidas se clasifican como persistentes, poco persistentes y no persistentes. Así, el uso mayoritario de los pesticidas organofosforados se debe a su moderada persistencia en el medio ambiente.

En la Figura 2 se muestra la clasificación de los pesticidas comentada anteriormente.

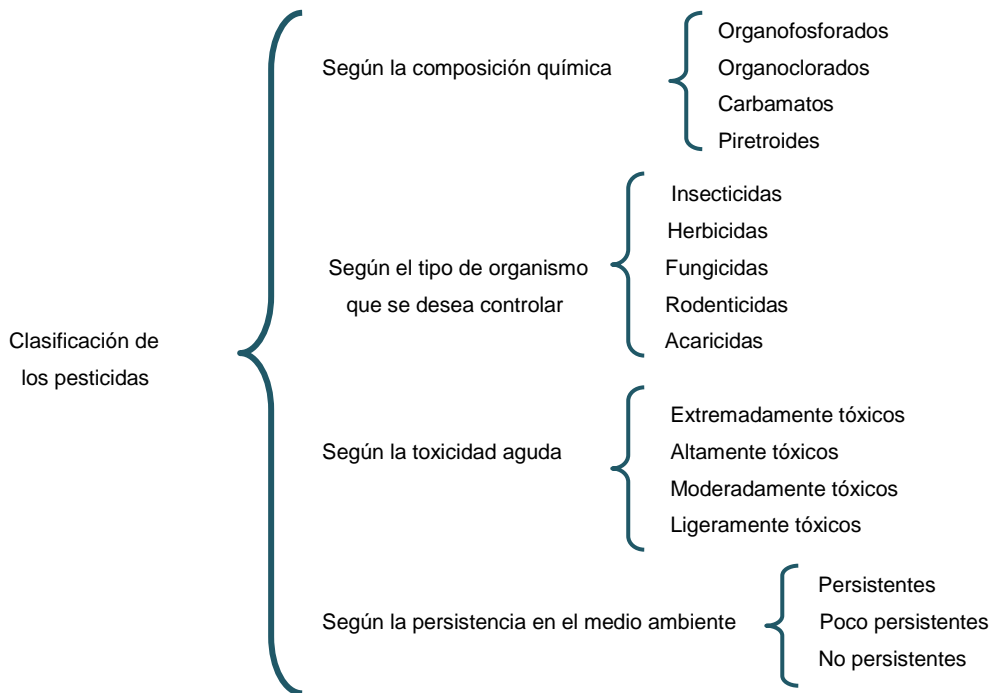


Figura 2. Clasificación de los pesticidas.

2. 2. UTILIZACIÓN DE LOS PESTICIDAS EN LA AGRICULTURA ACTUAL.

El constante crecimiento de la población mundial hace que la agricultura requiera una mayor producción de los cultivos que garantice el suministro de alimentos. Los parásitos y agentes externos ponen esto en riesgo, provocando consecuencias negativas en la economía del sector. Por ello, se hace imprescindible el uso de pesticidas que controlen plagas, enfermedades y malas hierbas, aumenten los periodos de desarrollo de las plantas y de almacenamiento post-cosecha, y reduzcan los costes de producción de los alimentos.

Actualmente, el uso de pesticidas en la agricultura es una actividad económica mundial muy importante. En España, los últimos datos disponibles de 2016 señalan que se consumieron 77.052 toneladas de pesticidas, representando los fungicidas el 50,5% de sustancias comercializadas (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2016). Sin embargo, la persistencia y distribución medioambiental de los pesticidas origina contaminación de suelos, agua y alimentos, lo que conlleva riesgos para la salud humana.

Por ello, es necesario monitorear y controlar las concentraciones de pesticidas en productos

agroalimentarios, desarrollando métodos capaces de determinarlas en todo tipo de muestras alimentarias y ambientales, y estableciendo sus concentraciones máximas admisibles.

En la actualidad, se están desarrollando nuevas líneas de investigación para fomentar el aumento de la producción, el rendimiento y la calidad de las cosechas con el menor impacto medioambiental y la mayor seguridad para la salud humana posibles, medidas englobadas por la llamada *agroecología* (Altieri y Nicholls, 2012). La creciente preocupación social por la seguridad alimentaria y la consciencia del daño que provocan los pesticidas al medioambiente hace que aumente cada año el número de cultivos ecológicos.

2. 3. LEGISLACIÓN APLICABLE.

Los organismos oficiales deben regular las concentraciones máximas admisibles de plaguicidas, tanto en aguas como en productos agroalimentarios. Dichas concentraciones se denominan *límites máximos de residuos* (LMR) de pesticidas en alimentos, y se definen como la máxima concentración de residuo de pesticida, expresado como miligramos de residuo por kilogramo de producto (mg/kg), probable a ocurrir en los productos alimenticios y alimentos para animales después del uso de pesticidas de acuerdo a las *buenas prácticas agrícolas* (BPA). A su vez, se definen las *BPA* como el uso seguro, recomendado, autorizado o registrado a escala nacional de productos fitosanitarios en condiciones reales, en cualquier fase de la producción, el almacenamiento, el transporte, la distribución y la transformación de alimentos y piensos. Implica la aplicación de los principios de control integrado de las plagas en una zona climática determinada, así como el uso de la cantidad mínima de pesticidas y el establecimiento de los LMR (Reglamento (CE) nº. 396/2005).

Los países en los que no existe normativa específica que regule los LMR siguen los valores establecidos por la Comisión Codex Alimentarius, programa creado en 1963 por la FAO y la OMS para proteger la salud de los consumidores, así como garantizar prácticas equitativas en el comercio de alimentos y promover la coordinación del conjunto de trabajos sobre normas alimentarias emprendidos por organizaciones gubernamentales e internacionales.

A nivel europeo, el Reglamento (CE) nº. 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de febrero de 2005 (Reglamento (CE) nº. 396/2005), relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal, y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo, es el responsable del establecimiento de dichos LMR. No obstante, se han ido publicando nuevos Reglamentos que modificaban ciertos anexos contenidos en el Reglamento (CE) nº. 396/2005, o en versiones posteriores, hasta la actual normativa europea, el Reglamento (UE) nº 2018/687, de la Comisión de 4 de mayo de 2018.

En la Tabla 1 se muestran los límites máximos de residuos de los principales pesticidas organofosforados en frutas (Comisión Europea, 2018).

Tabla 1. LMR (mg/kg) actuales de los principales pesticidas organofosforados en frutas (Comisión Europea, 2018).

Pesticidas	Frutas															
	Arándano	Ciruela	Coco	Frambuesa	Fresa	Granada	Gua-yaba	Mango	Manzana	Melón	Naranja	Papaya	Pera	Piña	Plátano	Uva
Acefato									0,01				0,01			
Azinfós-metilo							0,05	0,05	0,05			0,05	0,05			0,05
Bromofós-etilo									0,01		0,01		0,01			0,01
Clorfen-vinfós	0,01			0,01	0,01	0,01		0,01	0,01		0,01		0,01			0,01
Clorpirifós	0,05			0,01	0,20		0,05	0,05	0,01		0,30	0,05	0,01		3,00	0,30
Clorpirifós-metilo	0,05	3,00		0,05	0,50	0,30		0,05	0,50		0,50		0,05		0,05	0,20
Diazinón		0,01			0,01	0,01		0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01
Diclorvos	0,01			0,01	0,01	0,01		0,01	0,01		0,01		0,01			0,01
Dimetoato	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01			0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Disulfoton							0,01	0,01	0,01		0,01	0,01	0,01			0,01
Etión							0,01		0,01		0,01		0,01			0,01
Etoprofos											0,02				0,02	
Fenamifos													0,02		0,02	
Fenclorfos	0,01			0,01	0,01											0,01
Fenitrotión						0,01		0,01	0,01	0,01		0,01		0,01	0,01	0,01
Fentión	0,01			0,01	0,01			0,01	0,01		0,01		0,01			0,01
Forato	0,01			0,01	0,01	0,01		0,01	0,01		0,01		0,01			0,01
Fosalón						0,01		0,01	0,01				0,01			0,01
Fosfa-midón									0,01				0,01			
Fosmet													0,05		0,05	0,05
Malatión	0,02	0,02	0,02		0,02		0,02	0,02	0,02		2,00		0,02		0,02	0,02
Malatión-metilo	0,02			0,02	0,02											
Metami-dofós									0,01				0,01			
Metidatión							0,02		0,03				0,03			0,02
Mevinfós									0,01		0,01		0,01			0,01
Monocro-tofós									0,01				0,01			
Ometoato									0,01				0,01			0,01
Paratión-metilo						0,01		0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Pirazofos	0,01			0,01	0,01											0,01
Pirimifós-metilo	0,01			0,01	0,01								0,01			0,01
Profe-nofos						0,01	0,01	0,20			0,01		0,01			0,01
Quinalfos	0,01			0,01	0,01											0,01
Triazofos	0,01			0,01	0,01		0,01				0,01					0,01
Triclorfón			0,02						0,01				0,01			

Además, dada la necesaria vigilancia de la seguridad alimentaria, recientemente se publicó el Reglamento de Ejecución (UE) nº. 2018/555 de la Comisión, de 9 de abril de 2018, relativo a un programa plurianual coordinado de control de la Unión para 2019, 2020 y 2021 (Reglamento de Ejecución (UE) nº. 2018/555, 2018), destinado a garantizar el respeto de los límites máximos de residuos de plaguicidas en los alimentos de origen vegetal y animal, y a evaluar el grado de exposición de los consumidores a estos residuos.

3. PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

A menudo, los alimentos no pueden analizarse sin aplicar ciertas etapas de pretratamiento, ya que son muestras complejas en las que los contaminantes están muy diluidos.

Además, las normativas existentes requieren límites de detección (LOD) bajos, por lo que es esencial una preparación de las muestras (extracción, preconcentración y aislamiento de los analitos) eficaz, lo que influye de manera notable en la calidad de los resultados analíticos.

3. 1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.

Un método de extracción ideal ha de ser rápido, preciso, exacto, fácilmente adaptable al trabajo de campo, con bajo consumo de disolventes y empleo de materiales poco costosos. Las propiedades de los analitos y de la matriz son esenciales en la elección de la técnica apropiada para el aislamiento de los analitos de la muestra. No obstante, son también muy importantes las propiedades y las concentraciones de las sustancias interferentes, el tiempo de análisis, la simplicidad en la preparación de la muestra, y la inexistencia de efecto matriz.

A continuación, se comentan algunos de los métodos de extracción más empleados en la determinación de pesticidas organofosforados en frutas.

3. 1. 1. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE).

Se basa en la solubilidad relativa de un analito en dos fases inmiscibles. El disolvente (o mezcla de disolventes) empleado han de ser poco polar, como el analito (los pesticidas organofosforados), e inmiscible con la muestra. La eficacia del disolvente de extracción dependerá de este factor y de las etapas de extracción (Fernandes et al, 2011).

Desventajas tales como la complejidad, el coste, el tiempo requerido, la incapacidad de extraer pesticidas polares, la necesidad de evaporar grandes volúmenes de disolvente y de eliminar compuestos químicos inflamables o tóxicos, las normativas en el uso de disolventes orgánicos, las interferencias con la matriz, y las emulsiones difíciles de romper formadas a veces provocaron el desarrollo de nuevos métodos de extracción (Picó et al, 2007).

3. 1. 2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE).

Método de extracción alternativo a la LLE gracias a ventajas tales como la simplicidad, la rapidez y la menor cantidad de disolvente requerido. La muestra se dispersa en un cartucho relleno con adsorbente sólido (como la sílice, la alúmina, el florisil o el C₁₈), y los analitos quedan retenidos en él. Después, se eluyen con bajos volúmenes de disolvente.

3. 1. 2. 1. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME).

Método de extracción en fase sólida que utiliza una fibra de sílice fundida recubierta de un material adsorbente, generalmente polimérico, localizada en el interior de un tubo hueco y elegida según las características físicoquímicas de los compuestos a extraer.

Se da una etapa de extracción o retención de los analitos en la fase estacionaria (por absorción o adsorción) y una etapa de desorción (térmica, en el inyector de un cromatógrafo de gases; o con disolventes, manual o acoplada a un cromatógrafo de líquidos).

Se utiliza en tres modalidades: configuración espacio de cabeza (HS-SPME), inmersión directa (DI-SPME) y con protección de membrana (MP-SPME) (Akram y Mushtaq, 2018).

3. 1. 2. 2. DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA (MSPD).

Método de extracción en fase sólida basado en la dispersión total de una muestra acuosa en un adsorbente sólido gracias a la combinación del soporte de fase sólida y del disolvente.

Ocurre simultáneamente la extracción y la limpieza del extracto, por lo que se le considera uno de los métodos multiresiduo de extracción de pesticidas más rápidos (Xu et al, 2014).

Afectan a la eficacia de la MSPD el tamaño de partícula del adsorbente, la relación muestra/adsorbente, la polaridad de la fase retenida en el soporte y los disolventes de extracción, el volumen de elución y el efecto matriz que presenta la muestra.

3. 1. 3. EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (SFE).

Método de extracción en el que el dióxido de carbono presurizado, fluido supercrítico no tóxico, sustituye al disolvente orgánico empleado frecuentemente.

Los fluidos supercríticos se difunden a través de los sólidos como los gases, pero tienen la capacidad de disolver analitos como los líquidos, por lo que el porcentaje de extracción aumenta y ocurre una menor degradación térmica. No obstante, requiere equipamiento de alto coste y manipulación cuidadosa para obtener buenos resultados (Fernandes et al, 2011).

3. 1. 4. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE).

Su fundamento consiste en utilizar la energía microondas en un disolvente adecuado para extraer los analitos de una muestra gracias al aumento de temperatura que se produce, que favorece la transferencia al disolvente de los compuestos retenidos en la matriz.

Alternativa a la extracción Soxhlet que permite un calentamiento más eficiente y rápido de la muestra y utilizar disolventes menos tóxicos, reduce los costes de operación, el consumo de energía y disolvente, y mejora la estabilidad de los productos (Guillet et al, 2009).

3. 1. 5. QuEChERS.

Método de extracción denominado así por sus siglas en inglés (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). Publicado por Anastassiades et al en 2003, es actualmente el más utilizado gracias a que combina varios pasos de tratamiento y se aplica a más pesticidas en alimentos que otros métodos de extracción (Wilkowska y Biziuk, 2011).

Utiliza acetonitrilo para la extracción de los analitos, y la partición simultánea líquido-líquido

que resulta de la adición de sulfato de magnesio (MgSO_4) anhidro y cloruro de sodio (NaCl). Después de la centrifugación, se transfiere una porción del extracto a un tubo que contiene un adsorbente PSA (amina primaria/secundaria) y sulfato de magnesio anhidro.

Se mezcla y se centrifuga, y el extracto queda preparado para su análisis cromatográfico. La eliminación del agua residual y la limpieza del extracto se realizan simultáneamente gracias al procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva (DSPE) (Fernandes et al, 2011).

3. 2. PURIFICACIÓN O LIMPIEZA DE LOS EXTRACTOS.

Es un paso más en el pretratamiento de las muestras para su análisis cromatográfico, y su realización ha de ser evaluada en cada caso concreto, ya que presenta desventajas tales como un aumento del coste del método de determinación y el tiempo de análisis.

Se utiliza para evitar la contaminación del sistema cromatográfico y de detección y eliminar selectivamente los compuestos coextraídos, preservando la recuperación del analito y eliminando de la matriz posibles interferencias en la determinación del mismo. Concentra la muestra (enriquece el extracto en los analitos) y mejora la sensibilidad (Kmešlár et al, 2008).

Estos métodos se requieren habitualmente en el análisis de pesticidas para minimizar el efecto matriz y conseguir una mayor robustez, identificación y disminución de los límites de cuantificación (LOQ), al disminuir el ruido químico o aumentar la señal del analito.

La cromatografía de permeación en gel (GPC) es un método universal para la limpieza de los extractos en multitud de matrices y pesticidas de varias clases, ya que solo se producen interacciones físicas para su separación. Otros métodos alternativos son los cartuchos de extracción en fase sólida, o la extracción en fase sólida dispersiva (Dömötöróvá y Matisová, 2008), empleando distintos tipos de adsorbentes, tales como el carbón activo, polares como la sílice, la alúmina y el Florisil, o apolares como el C_8 , C_{18} o el ciclohexil.

4. CROMATOGRAFÍA DE GASES.

La cromatografía de gases (GC) es, en general, una técnica analítica ampliamente utilizada en la determinación de residuos de pesticidas en toda clase de alimentos. En particular, es muy utilizada para la determinación de compuestos organofosforados.

4. 1. PRINCIPIO O FUNDAMENTO TEÓRICO.

Se trata de una técnica empleada para la determinación de analitos volátiles y térmicamente estables. La muestra volatilizada se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica y los analitos quedan retenidos en la fase estacionaria, inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte, un cierto tiempo en función de sus propiedades físicoquímicas y las de las fases móvil y estacionaria. Se produce la elución de los analitos por el flujo de una fase móvil gaseosa (generalmente, de un gas inerte como el helio o el nitrógeno) que no interacciona con las moléculas de analito, solo lo transporta a través de la columna.

Hoy en día, predomina el uso de columnas capilares, que proporcionan mejores límites de detección al ser más sensibles que las tradicionales columnas empaquetadas. Poseen diámetros internos menores de 1mm y paredes habitualmente recubiertas de una película de fase estacionaria, generalmente de polímeros de polisiloxano o polietilenglicoles.

Existen varios modos de inyección de la muestra en la columna: modo *split/splitless*, que reduce la cantidad de muestra que llega a la cabeza de la columna para mantenerla en el intervalo correcto, modo *splitless*, utilizado cuando las muestras poseen una concentración baja de analito y modo *split*, que consiste en el flujo continuo del gas portador, siendo expulsado el flujo excesivo y llegando a la columna solo una fracción de la muestra.

4. 2. SISTEMAS DE DETECCIÓN.

Los detectores se utilizan para identificar los analitos presentes en una muestra. Miden los cambios que se producen en determinadas propiedades físicas o químicas de los mismos al eluirse por la columna y ser separados.

4. 2. 1. PRINCIPALES DETECTORES UTILIZADOS.

Los principales detectores acoplados a un cromatógrafo de gases que se utilizan para identificar pesticidas organofosforados en frutas son:

- **Detector de ionización de llama (FID):** Es el detector más utilizado, y se basa en la mezcla del efluente de la columna con hidrógeno y aire en un quemador. Cuando la mayoría de los compuestos orgánicos se pirolizan a la temperatura de una llama de hidrógeno/aire, forman iones que se conducen por una diferencia de potencial hacia un electrodo colector. Detecta los iones de carbono que se forman durante la combustión a alta temperatura, por lo que en la práctica es un detector universal, ya que son muy pocos los compuestos que no presentan enlaces C-H. Sin embargo, no pueden detectar H₂O, N₂ y CO₂.
- **Detector de captura de electrones (ECD):** Detector selectivo para compuestos que contienen halógenos. Se ioniza el gas portador, generalmente N₂, produciéndose una ráfaga de electrones (e⁻) que genera una corriente eléctrica constante alterada por la presencia de especies muy electronegativas en el efluente de la columna, por su tendencia a captar e⁻. Se trata de un detector de elevada sensibilidad, pero intervalo de respuesta lineal limitado normalmente a dos órdenes de magnitud.
- **Detector de nitrógeno-fósforo (NPD):** También conocido como detector termoiónico (TID), se trata de un detector selectivo para compuestos orgánicos que contienen átomos de nitrógeno o de fósforo, por lo que se utilizan frecuentemente para la determinación de pesticidas organofosforados. Su fundamento es similar al del detector FID.
- **Detector fotométrico de llama (FPD):** Detector muy sensible a impurezas, selectivo para

compuestos que contienen azufre o fósforo, que emplea una llama de hidrógeno o aire por la que se pasa la muestra, generando los compuestos quimioluminiscencia a determinadas longitudes de onda. Un fotomultiplicador mide la intensidad de la radiación emitida.

4. 2. 2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS COMO SISTEMA DE DETECCIÓN.

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica basada en la ionización de las muestras, y la separación y el registro de los iones o fragmentos que se producen en función de su relación masa/carga en el espectrómetro de masas, que consta de tres partes fundamentales: la fuente de iones, el analizador de iones o masas y el detector.

Se trata de una técnica rápida, universal, específica, cuantitativa y cualitativa (ya que puede proporcionar información estructural), que permite analizar mezclas complejas.

Actualmente, es el sistema de detección más empleado para la determinación de pesticidas en alimentos, ya que el acoplamiento GC-MS es altamente selectivo y sensible para el análisis de compuestos relativamente apolares, volátiles y térmicamente estables. En el caso de sustancias polares, es necesaria una etapa de derivatización.

Entre las principales fuentes de ionización destacan la de impacto electrónico (EI) y la de ionización química (CI), que se diferencian principalmente en el agente ionizante (electrones energéticos e iones gaseosos reactivos, respectivamente).

La más utilizada es la de EI, que genera fragmentos característicos que pueden consultarse en bases de datos existentes con los espectros de masas de multitud de compuestos.

Por su parte, los analizadores más utilizados son los de un cuadrupolo, Q, seguidos de los de trampa de iones (IT), tiempo de vuelo (TOF), sector eléctrico (E) o sector magnético (B).

Existen 2 modos para realizar la adquisición de los datos: modo de barrido (*full scan*), en el que se detecta un intervalo de masas, y modo SIM (*selected ion mode*), que solo considera las masas características de los compuestos de interés, lo que incrementa la sensibilidad.

Actualmente, también se utiliza la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS), que consiste en el acoplamiento de dos espectrómetros de masas, lo que aumenta notablemente la selectividad y sensibilidad de la técnica.

El primer analizador aísla los iones moleculares del resto de componentes de la muestra, que se introducen en el segundo analizador y se fragmentan y separan en función de su relación masa/carga, llegando secuencialmente al detector para dar una serie de espectros de masas. También puede realizarse secuencialmente en un único analizador de masas.

4. 3. CROMATOGRAFÍA DE GASES MULTIDIMENSIONAL (GCxGC).

De reciente desarrollo, la GCxGC consiste en el acoplamiento de dos sistemas cromatográficos, cada uno con una fase estacionaria de distinta naturaleza, sometiéndose la muestra a dos separaciones independientes en un único análisis.

Esto multiplica la resolución cromatográfica, la selectividad, la sensibilidad, y la información obtenida sobre la identificación de los componentes, así como el número de pesticidas separados con respecto a la GC convencional.

5. DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN FRUTAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES.

A continuación, se resumen las principales investigaciones realizadas durante los últimos 10 años en la determinación de pesticidas organofosforados en frutas mediante la técnica de cromatografía de gases, ordenadas por año de publicación.

En el año 2008, Schenck et al desarrollaron un método multiresiduo de determinación de hasta 316 pesticidas, de los cuales 34 son organofosforados, en verduras y frutas como la pera utilizando como método de extracción una modificación del método QuEChERS. En ella, se eliminan el NaCl y el MgSO₄ que se utilizan habitualmente en dicho método.

La determinación de pesticidas se hace mediante varias técnicas diferentes, tales como: GC-MS/MS, GC/FPD, GC/detección fotométrica de llama pulsada (GC/PFPD) y GC/sistema de detección específico de halógeno (GC/XSD).

Se fortificaron las muestras con aproximadamente dos veces el límite de cuantificación (LOQ) para cada instrumento utilizado, definido como el nivel al cual la relación señal-ruido (S/N) es mayor o igual de 10. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 2. Técnica analítica utilizada, concentración de pesticida añadida (ppm), recuperación (%), coeficiente de variación (%) y LMR (ppm) de los pesticidas estudiados en muestras de pera (Schenck et al, 2008).

Pesticida	Técnica de detección	Concentración de patrón añadida (ppm)	Recuperación (%)	Coefficiente de variación (%)	LMR (ppm)
Acefato	GC/FPD	0,03	89,7	15,6	0,01
Azinfós-metilo	GC/FPD	0,08	93,4	6,0	0,05
Clorpirifós	GC/FPD	0,03	91,8	5,7	0,01
Clorpirifós-metilo	GC/FPD	0,08	94,0	9,1	0,05
Cumafós	GC-MS/MS	0,03	110,7	12,3	-
Diazinón	GC/FPD	0,03	89,4	6,4	0,01
Diclorvos	GC/FPD	0,05	77,1	11,6	0,01
Dimetoato	GC/FPD	0,03	91,3	7,7	0,01
Disulfotón	GC/FPD	0,03	92,8	12,2	0,01
Disulfotón sulfona	GC/FPD	0,03	105,0	11,1	0,01
Etión	GC/FPD	0,03	92,9	3,8	0,01
Fenamifos	GC/FPD	0,00	95,0	4,2	0,02
Fentión	GC/FPD	0,05	91,3	5,5	0,01
Fonofos	GC/FPD	0,03	87,3	5,2	-
Malatión	GC/FPD	0,03	93,0	4,9	0,02
Malatión análogo oxigenado	GC/FPD	0,04	101,8	13,7	0,02
Metamidofós	GC/FPD	0,05	91,0	14,5	0,01
Metidatión	GC/FPD	0,03	101,1	10,0	0,02
Mevinfós, (E)-	GC/FPD	0,05	85,5	7,3	0,01
Monocrotofós	GC/FPD	0,05	101,3	9,9	0,01
Omtoato	GC/FPD	0,05	133,0	20,7	0,01
Oxidemetón-metil sulfona	GC/FPD	0,15	96,9	11,7	0,01

Tabla 2 (continuación)

Pesticida	Técnica de detección	Concentración patrón añadida (ppm)	Recuperación (%)	Coefficiente de variación (%)	LMR (ppm)
Paratión	GC/FPD	0,05	101,7	11,0	0,05
Paratión-metilo	GC/FPD	0,03	90,8	5,0	0,01
Forato	GC/FPD	0,03	92,3	12,2	0,01
Forato sulfona	GC/FPD	0,08	101,9	10,9	0,01
Fosalón	GC/XSD	0,10	91,6	7,1	0,01
Fosmet	GC/FPD	0,05	97,6	7,8	0,05
Fosfamidón	GC/FPD	0,03	105,0	16,4	0,01
Pirimifos-metil	GC/FPD	0,03	99,8	11,6	0,01
Profenofos	GC/FPD	0,08	102,0	9,9	0,01
Propetamfos	GC/FPD	0,03	100,0	14,5	-
Terbufos	GC/FPD	0,03	96,2	13,9	0,01
Terbufos sulfona	GC/FPD	0,03	102,6	10,0	-

Se observa que las recuperaciones fueron del 77,1-110,7% excepto para el ometoato, que fue del 133%. Por su parte, los coeficientes de variación obtenidos para todos los pesticidas fueron menores del 20% requerido, con la excepción también del ometoato (20,7%).

La extracción SPE en columna amino y el disolvente utilizado para la elución (acetona-tolueno, 3+1) contribuyeron a mantener la estabilidad de los pesticidas, lo que proporcionó mejores resultados en su determinación. Además, la modificación realizada del método QuEChERS redujo el volumen de los residuos generados, y el del disolvente en un 65%.

Por tanto, se trata de un método muy adecuado para la determinación de una gran variedad de pesticidas organofosforados en frutas como la pera.

Cho et al evaluaron en el año 2008 diferentes métodos de extracción, tales como la extracción acelerada por disolvente (ASE), la extracción con fluidos supercríticos (SFE) y la extracción líquido-líquido (LLE). Desarrollaron un método para la determinación de residuos de pesticidas en kiwi, entre los que se encuentran los pesticidas organofosforados clorpirifós-metilo y EPN, mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS).

Para aplicar la ASE, se utilizó una mezcla de disolventes acetona-*n*-hexano (2:8 v/v). Se empleó CO₂ modificado con un 30% en volumen de metanol (MeOH) como disolvente de extracción en el método de SFE, y en la extracción líquido-líquido se extrajo la porción de 20g de kiwi con acetona, y más tarde por duplicado con *n*-hexano.

El análisis de los pesticidas por GC-MS se realizó con un cromatógrafo con puerto de inyección split/splitless y columna capilar recubierta con una mezcla 5% difenilo y 95% dimetilpolisiloxano, entre otras características. En cuanto al espectrómetro de masas, se utilizó analizador cuadrupolo y modo *full scan*.

En la Figura 3 se muestran los espectros de masas de los pesticidas y los cromatogramas GC-MS de las muestras de kiwi y la disolución estándar mezcla de pesticidas.

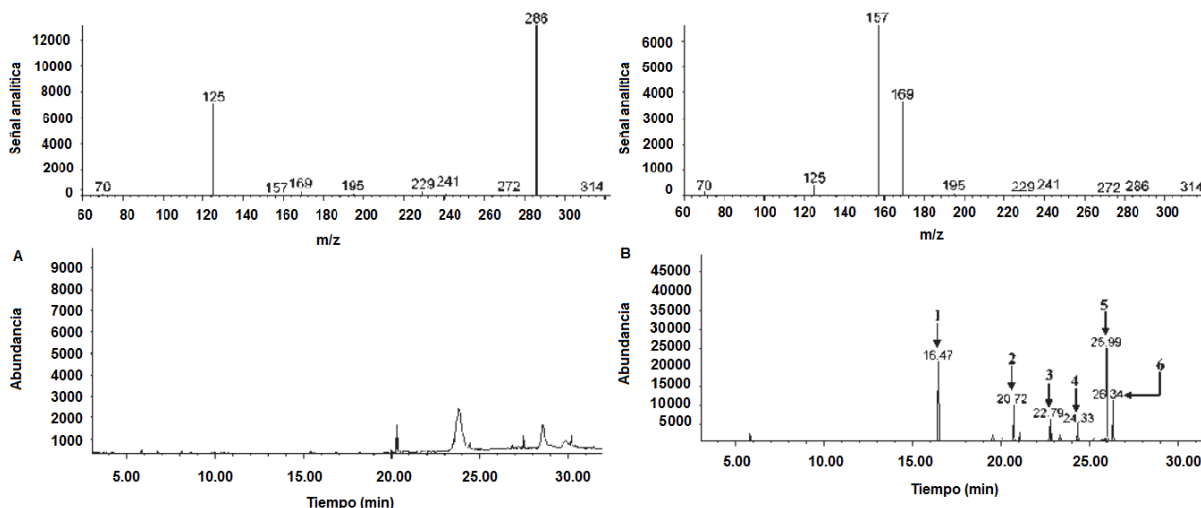


Figura 3. En las imágenes de arriba, espectro de masas del clorpirifós-metilo (a la izquierda), y del EPN (a la derecha). Abajo a la izquierda, cromatograma GC-MS de la muestra de kiwi, y a la derecha, de la disolución estándar mezcla de los pesticidas analizados. Picos: 1. Clorpirifós-metilo, 6. EPN (Cho et al, 2008).

Dado que no hubo picos de interferencias alrededor de los analitos, se utilizaron las curvas de calibración construidas en disolvente puro cualitativa y cuantitativamente, en el intervalo de concentraciones 0,01-1,00ppm, y se obtuvieron coeficientes de correlación de 0,982 para el EPN y 0,995 para el clorpirifós-metilo.

También se determinaron el LOD y el LOQ, definidos como la concentración de analito que genera una respuesta 3 veces y 10 veces mayor, respectivamente, que el nivel de ruido del sistema de detección (que incluye el ruido instrumental y la señal de fondo aportada por el blanco de matriz). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. LOD, LOQ y LMR (ppm) del clorpirifós-metilo y el EPN utilizando la técnica GC-MS (Cho et al, 2008).

Pesticida	ASE		SFE		LLE		LMR
	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	
Clorpirifós-metilo	0,005	0,015	0,005	0,015	0,003	0,008	0,05
EPN	0,005	0,015	0,005	0,015	0,003	0,008	-

Como podemos observar, los menores LOD (0,003ppm) y LOQ (0,008ppm) obtenidos para ambos pesticidas son idénticos, y se obtuvieron con la LLE, gracias a que el procedimiento de limpieza en columna adicional eliminó moléculas de mayor tamaño, como lípidos y pigmentos, lo que permite una mejor identificación de residuos de pesticidas de menor concentración y minimiza efectos adversos de los instrumentos de detección. Además, dichos valores son inferiores a los LMR establecidos para los pesticidas en kiwi.

En la Tabla 4 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos para cada pesticida estudiado, calculados comparando las áreas de pico obtenidas para las muestras de kiwi dopadas con concentraciones conocidas de pesticidas, con las de las disoluciones estándar disueltas en un disolvente orgánico.

Tabla 4. Recuperaciones (media \pm RSD, %) de los pesticidas en muestras de kiwi extraídos por los métodos de extracción ASE, SFE y LLE utilizando la técnica GC-MS (Cho et al, 2008).

Pesticida	Nivel de fortificación (ppm)	ASE Recuperación (%)	SFE Recuperación (%)	LLE Recuperación (%)
Clorpirifós-metilo	1,0	86,5 \pm 3,9	71,9 \pm 1,56	84,2 \pm 1,33
	0,1	110,9 \pm 2,76	84,0 \pm 3,0	104,7 \pm 2,92
EPN	1,0	77,5 \pm 1,38	76,3 \pm 5,18	75,6 \pm 3,74
	0,1	86,3 \pm 1,33	81,1 \pm 2,37	86,2 \pm 5,8

Las recuperaciones para el clorpirifós-metilo y el EPN son del 71,9%-110,9%, obteniéndose los mejores resultados para el caso del clorpirifós-metilo mediante la LLE (84,2-104,7%) y mediante la ASE para el EPN; aunque en este caso presentan pocas diferencias los 3 métodos de extracción. Además, los valores de RSD son inferiores al 5,8%.

En función de todos los resultados obtenidos, el método permite la determinación de los analitos estudiados en muestras de kiwi, lo que supone un gran avance al haber utilizado métodos de extracción con menor consumo de disolvente y más rápidos (como ASE y SFE), y de menor coste y especificidad de instrumentación en la LLE.

Dantas Silva et al desarrollaron ese mismo año un método para la determinación de residuos de pesticidas en coco mediante GC-MS, utilizando la técnica de extracción MSPD.

Se evaluó el efecto matriz comparando la respuesta del detector de disoluciones patrón de los pesticidas a determinar (dimetoato, malatión y triclorfón, entre otros) diluidas con diclorometano con la respuesta de las disoluciones de calibrado preparadas en blancos de muestras de pulpa de coco. El área de pico fue mayor en este último caso para concentraciones iguales, por lo que se utilizaron esas disoluciones para el calibrado y la cuantificación de pesticidas en muestras reales.

En la Figura 4 se muestran los cromatogramas obtenidos para las soluciones estándar de pesticidas y de las muestras de coco fortificadas, utilizando el sistema GC/MS en modo SIM. Como podemos observar en la imagen, la resolución obtenida fue satisfactoria.

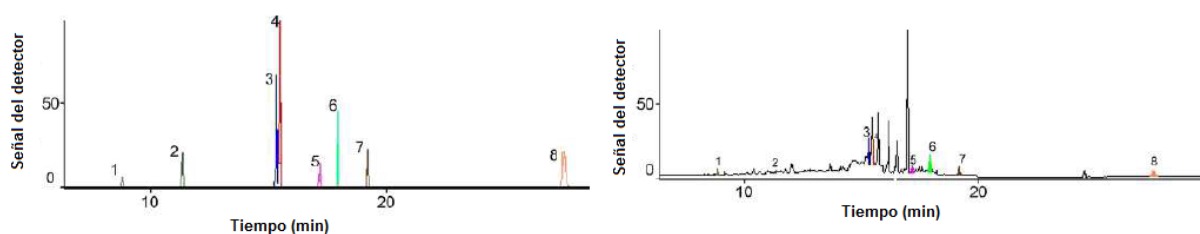


Figura 4. A la izquierda, cromatograma de la solución estándar de pesticidas a 1,0mg/kg de concentración. Identificación de picos: 1. Triclorfón, 3. Dimetoato, 6. Malatión. A la derecha, cromatograma del extracto de pulpa de coco fortificado a concentración 0,25mg/kg. Identificación de picos: 1. Triclorfón, 3. Dimetoato, 6. Malatión (Dantas Silva et al, 2008).

Una vez optimizados el adsorbente, la proporción adsorbente/matriz y el eluyente, se evaluaron las recuperaciones obtenidas, dopando las muestras con concentraciones

conocidas de disolución estándar de pesticidas en el intervalo de 0,25-1,00mg/kg, y realizando cuatro réplicas a cada nivel de concentración.

Las Tablas 5 y 6 muestran los resultados obtenidos en función de los adsorbentes, los eluyentes, y la proporción adsorbente/matriz utilizados.

Tabla 5. Influencia del eluyente en la recuperación de pesticidas usando Florisil como adsorbente en fase sólida en el procedimiento MSPD utilizando 2,0g de pulpa de coco + 1,0g de adsorbente (Dantas Silva et al, 2008).

Pesticida	Recuperación (%)				
	Florisil				Diclorometano
	Diclorometano:acetona (v/v)				
1:9	1:4	2:3	9:1		
Triclorfón	56	182	17	283	—
Dimetoato	26	21	7	61	30
Malatión	42	22	5	70	28

Tabla 6. Influencia de C₁₈ como adsorbente en fase sólida en la recuperación de pesticidas en el procedimiento MSPD utilizando 2,0g de pulpa de coco + 1,0g de adsorbente (Dantas Silva et al, 2008).

Pesticida	Recuperación (%)					
	Diclorometano:acetona (9:1,v/v)				n-Hexano:acetato de etilo (1:1,v/v)	Acetato de etilo
	C ₁₈	C ₁₈ /alúmina	C ₁₈ /sílice	C ₁₈ /Florisil	C ₁₈	C ₁₈
Triclorfón	212	56	17	100	-	-
Dimetoato	21	26	7	41	13	13
Malatión	22	42	5	65	7	6

Los mejores resultados se obtuvieron utilizando 0,5g de pulpa de coco, 1,0g de C₁₈ como adsorbente dispersante y 1,0g de Florisil como adsorbente de limpieza de extracto.

Además, solo el ensayo en el que se emplea diclorometano:acetona (9:1 v/v) proporciona recuperaciones algo razonables (41-100%), por lo que se decidió optimizar la proporción de acetonitrilo y su combinación con otros disolventes orgánicos como eluyente del método, utilizando ya C₁₈ y Florisil como adsorbentes. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Influencia de la proporción de acetonitrilo como eluyente en la recuperación de los pesticidas en el procedimiento MSPD utilizando C₁₈ y Florisil como adsorbentes de fase sólida (Dantas Silva et al, 2008).

Pesticida	Recuperación (%)					
	Acetonitrilo (mL)			C18/Florisil		
	20	30	40	Acetonitrilo:n-hexano (saturado)	Acetonitrilo:acetato de etilo (1:1, v/v)	
Triclorfón	135	134	150	93	192	
Dimetoato	33	45	102	99	78	
Malatión	33	65	132	76	103	

Por tanto, los mejores resultados se obtienen utilizando la mezcla de acetonitrilo saturado con n-hexano, que proporciona recuperaciones entre el 76% y el 99%.

Una vez optimizados los parámetros de extracción, se realizó la validación del método. En la Tabla 8 se recogen las recuperaciones medias obtenidas en los 3 niveles de concentración estudiados para cada pesticida organofosforado, que fueron del 70,2-98,7%, y sus RSD (%).

Tabla 8. Recuperaciones y desviaciones estándar relativas (%) obtenidas por el procedimiento de extracción MSPD en las muestras de pulpa de coco fortificadas para los pesticidas estudiados (Dantas Silva et al, 2008).

Pesticida	Nivel de concentración (mg/kg)	Recuperación media (%)	RSD (%)
Triclorfón	0,25	87,7	10,0
	0,50	81,1	10,1
	1,00	70,2	11,8
Dimetoato	0,25	98,7	12,1
	0,50	90,7	2,7
	1,00	91,7	13,2
Malatión	0,25	77,2	11,4
	0,50	87,7	14,1
	1,00	82,6	11,6

Los valores de exactitud y precisión (determinada como %RSD) se consideraron adecuados para el método de acuerdo con el criterio de validación.

Por su parte, la respuesta del detector fue lineal en el intervalo de concentración estudiado. Como podemos observar en la Tabla 9, se obtuvieron coeficientes de correlación lineal para todos los pesticidas comprendidos entre 0,9972 y 0,9992.

El LOD se calculó considerando un valor de 7 veces la desviación estándar del blanco y la pendiente de la recta de calibración, y fue de 0,15mg/kg para el triclorfón, 0,16mg/kg para el malatión y 0,17mg/kg para el dimetoato. Por su parte, el LOQ se determinó utilizando siete muestras no fortificadas, y se obtuvo un valor de 0,25mg/kg para los tres compuestos.

Tabla 9. Datos de calibración de los pesticidas analizados por GC/MS (Dantas Silva et al, 2008).

Pesticida	Tiempo de retención (min)	Datos de calibración		LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
		Ecuación	Coefficiente de correlación		
Triclorfón	8,87	$y = 10974,3x + 4081,6$	0,9977	0,15	0,25
Dimetoato	15,45	$y = 399118,5x - 46448$	0,9972	0,17	0,25
Malatión	17,98	$y = 220380,1x - 73,9$	0,9992	0,16	0,25

Dado que los LMR para los pesticidas triclorfón, malatión y dimetoato en coco son de 0,02mg/kg, 0,02mg/kg y 0,01mg/kg respectivamente, actualmente el método no sería válido para la determinación propuesta. Esto refleja que la legislación europea es cada vez más estricta en la regulación de concentraciones máximas de residuos de pesticidas permitidas.

También en 2008, Húšková et al desarrollaron un método multiresiduo para la determinación de pesticidas en manzanas por GC rápida-MS. Se trata de una variación de la GC tradicional que utiliza columnas capilares de diámetro estrecho, lo que supone una ventaja al reducir el efecto matriz provocado por las sustancias coextraíbles presentes en las muestras sobre las que se analizan los residuos de pesticidas.

Además, emplean la inyección con vaporizador con temperatura programada (PTV) como alternativa a la inyección *splitless* y, de nuevo, el método de extracción QuEChERS.

Las siete disoluciones de calibrado con los 13 pesticidas organofosforados objeto de estudio se prepararon sobre manzanas sin haber sido tratadas con pesticidas, es decir, blancos de

muestras, añadiendo sobre ellas concentraciones conocidas de los pesticidas en el intervalo 1-500ng/mL (equivalente a $\mu\text{g}/\text{kg}$ en las muestras). Además, se añadió a todas ellas el patrón interno trifenilfosfato (TPP) en concentración 10ng/mL.

Con las rectas de calibración obtenidas, se determinó el intervalo lineal y los límites de detección y cuantificación. Cabe destacar que se realizó el análisis cromatográfico de las disoluciones de calibrado 5 veces, empezando por la concentración más baja.

La Tabla 10 recoge los coeficientes de correlación obtenidos para las rectas del calibrado, y el LOD y el LOQ del método para los pesticidas analizados y el patrón interno, TPP.

Tabla 10. Datos obtenidos del análisis de los pesticidas y el patrón interno TPP estudiados (Hůšková et al, 2008).

Pesticidas	Tiempo de retención (min)	Iones monitorizados en SIM	Frecuencia de adquisición de datos	R^2 (A_i)	R^2 (A_i/A_{TPP})	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Diclorvos	3,67	109, 185, 220	6,45	0,993	0,9945	0,33	1,1
Metamidofós	3,74	141, 95, 94		0,994	0,9949	0,24	0,8
Mevinfós	4,27	127, 192, 164		0,995	0,9959	0,28	0,93
Acefato	4,37	136, 95, 125		0,932	0,9487	0,62	2,06
Monocrotofós	5,33	127, 192, 223		0,97	0,9712	0,31	1,03
Dimetoato	5,48	87, 93, 125		0,997	0,9978	0,46	1,53
Diazinón	4,67	304, 276, 179	3,28	1	10.000	2,4	7,99
Clorpirifós- metilo	6,07	286, 288, 125	4,35	0,997	0,9984	3,7	12,32
Fenitrotión	6,33	277, 260, 125		0,996	0,997	0,45	1,5
Malatión	6,37	127, 158, 173		0,991	0,9934	0,37	1,23
Clorpirifós	6,44	314, 286, 197		1	0,9999	2,41	8,03
Metidatión	6,97	145, 125, 302		0,999	0,9998	0,52	1,73
TPP (P.I.)	8,02	326, 325		–	–	–	–
Fosalón	8,54	182, 184, 367	3,92	0,999	0,9993	0,45	1,5

El coeficiente de correlación fue calculado para áreas de pico absolutas (A_i) y áreas normalizadas a TPP (A_i/A_{TPP}) para la calibración de los pesticidas individuales. Se obtuvieron coeficientes de correlación en el intervalo 0,9318-0,9998, que mejoraron con la normalización para la mayoría de los compuestos, obteniéndose valores de 0,9487-1,0000.

El LOD se calculó como 3 veces la relación señal/ruido, y el LOQ como 10 veces dicha relación. Se obtuvieron valores de 0,24-3,70ng/mL y 0,80-12,32ng/mL, respectivamente.

El análisis en muestras reales se realizó por triplicado, utilizando columna recubierta con una película de CP-Sil 8CB (5% difenil, 95% dimetilsiloxano) conectada a una precolumna apolar desactivada, PTV en modo de ventilación solvente, ionización por EI, y modo SIM.

Se compararon dos métodos SIM, el primero para la calibración (Método 1), para determinar el rango de respuesta lineal del detector MS y chequear la repetibilidad de la medida del área de pico (RSD) a diferentes concentraciones; y el segundo para el análisis de una pequeña cantidad de pesticidas en muestras reales (Método 2).

Tenían diferente número de compuestos monitoreados, grupos SIM, iones monitoreados en los grupos SIM, y frecuencia de adquisición de datos. Los resultados mostraron diferencias no significativas, siendo ambos adecuados para el análisis de residuos de pesticidas.

En la Tabla 11 se muestran las concentraciones, así como las RSD obtenidas para las muestras analizadas por triplicado en dos muestras paralelas por análisis GC-MS.

Tabla 11. Concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de pesticidas en muestras de manzana, con RSD (en %) (Húšková et al, 2008).

Pesticida	Método 1						Método 2					
	A_i			A_i/A_{TPP}			A_i			A_i/A_{TPP}		
	C_i	RSD PA	RSD GC	C_i	RSD PA	RSD GC	C_i	RSD PA	RSD GC	C_i	RSD PA	RSD GC
Fenitrotión	18,85	2,5	4,9	18,83	4,6	3,3	17,02	4,0	3,8	17,44	2,5	3,9
Metidatión	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TPP (P.I.)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Como podemos observar, se identificó el pesticida fenitrotión en concentración inferior al LMR establecido en manzanas. Por su parte, no se identificó metidatión en las muestras. Además, el uso del patrón interno trifenilfosfato mejoró la linealidad y repetibilidad obtenidas con las medidas de área de pico absolutas. Por todo ello, el método resulta apto para el análisis multiresiduo de pesticidas en manzanas.

Un año más tarde, la misma autora publicó un método para el análisis ultratraza de 25 pesticidas de diferentes clases químicas en varias frutas mediante la misma técnica, comparando la ionización química negativa (NCI) y la de impacto electrónico (EI).

Las disoluciones del calibrado se prepararon sobre manzanas sin tratar con pesticidas (blancos de muestras), al presentar un efecto matriz similar al de las muestras reales sobre las que se aplicó este método: naranja, ciruela y fresa. Además, se añadió heptacloro (HPT) como patrón interno a todas ellas.

Para el modo NCI, se prepararon 10 disoluciones de calibrado mezcla de los pesticidas objeto de estudio en concentraciones de $0,01\text{-}150\mu\text{g}/\text{kg}$, mientras que para el modo EI se prepararon 7 disoluciones ($1\text{-}500\mu\text{g}/\text{kg}$). La Tabla 12 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 12. Tiempos de retención, iones monitorizados, frecuencia de adquisición de datos y coeficientes de correlación de los patrones preparados en blancos de muestras en base a áreas de pico absolutas (A_i) y áreas normalizadas a heptacloro (A_{HPT}) en los métodos de ionización NCI y EI (Húšková et al, 2009).

Modo de detección	NCI				EI				
	Tiempo de retención (min)	Iones monitorizados	Frec. adq. datos (scans/s)	R^2 (A_i)	R^2 (A_i/A_{HPT})	Iones monitorizados	Frec. adq. datos (scans/s)	R^2 (A_i)	R^2 (A_i/A_{HPT})
Dimetoato	5,73	157, 159, 158		0,9997	0,9998	87, 93, 125		0,9984	0,9980
Clorpirifós-metilo	6,36	212, 214, 285	6,68	0,9999	0,9998	286, 288, 125	6,89	0,9990	0,9991
Malatión	6,68	157, 159, 158	9,39	0,9998	0,9998	173, 125, 93	8,47	0,9995	0,9997
Diazinón	7,25	167, 168, 169		0,9989	0,999	287, 302, 288		0,9988	0,9980

Como podemos observar, los coeficientes de correlación obtenidos en el intervalo de concentraciones estudiado de 0,01-150µg/kg en el modo NCI en base a las áreas de pico absolutas fueron de 0,9989-0,9999, y de 0,9990-0,9998 para las áreas normalizadas.

Por su parte, para el modo EI, los coeficientes de correlación obtenidos en el intervalo de concentraciones 1-500µg/kg fueron de 0,9984-0,9995 para las áreas absolutas y 0,9980-0,9997 para las normalizadas. Por tanto, el uso del patrón interno heptacloro para corregir pérdidas de analito durante las operaciones analíticas proporciona resultados mejores.

Además, el método es lineal. En la Tabla 13 se muestran los LOD y LOQ instrumentales obtenidos en los dos modos de detección a los niveles más bajos de calibración (LCLs).

Tabla 13. Áreas de pico absolutas (RSD_{Ai}) y normalizadas a heptacloro (RSD_{HPT}) de los pesticidas, y LOD y LOQ en los dos modos de ionización (NCI, EI) a los niveles de calibración más bajos, LCLs (Húšková et al, 2009).

Modo de Detección	NCI					EI				
	LCL (ng/mL)	RSD_{Ai} (%)	RSD_{HPT} (%)	LOD (pg/mL)	LOQ (pg/mL)	LCL (ng/mL)	RSD_{Ai} (%)	RSD_{HPT} (%)	LOD (pg/mL)	LOQ (pg/mL)
Dimetoato	0,05	5,3	4,9	33,11	110,37	1,00	8,2	7,6	0,16	0,53
Clorpirifós-metilo	0,05	4,9	4,0	33,75	112,50	1,00	8,6	8,6	0,08	0,27
Malatión	0,05	3,4	6,5	38,78	129,27	1,00	11,2	12,0	0,34	1,13
Diazinón	0,10	4,0	4,6	55,05	183,50	1,00	8,1	7,5	0,09	0,28

La repetibilidad de las medidas (como %RSD) fue del 3,4-5,3% y de 4,0-6,5% (áreas de pico absolutas y normalizadas, respectivamente) para el modo NCI y de 8,1-11,2% y 7,5-12,0% para el modo EI, cumpliendo el criterio de la UE de ser inferior al 20%.

Para el LOD y el LOQ, se obtuvieron valores de 33,11-55,05pg/mL y 110,37-183,50pg/mL, respectivamente, para el modo NCI. En el modo EI, los valores de LOD y LOQ obtenidos fueron de 0,08-0,34pg/mL y 0,27-1,13pg/mL, respectivamente.

Los valores obtenidos de LOD y LOQ se encuentran por debajo de los LMR establecidos para los pesticidas y las matrices analizadas, por lo que el método tiene un gran potencial en el análisis ultratraza de residuos de pesticidas.

La extracción de los pesticidas se realizó mediante el método QuEChERS, y las recuperaciones del método se estudiaron fortificando muestras de manzanas sin tratar con disolución mezcla de los pesticidas dimetoato, clorpirifós-metilo, malatión y diazinón en acetonitrilo a los niveles de concentración 5µg/kg (6 réplicas), 10µg/kg (6 réplicas) y 250µg/kg (3 réplicas) para el experimento GC-EI-MS, y a las concentraciones 0,1µg/kg, 1µg/kg, 5µg/kg y 150µg/kg (6 réplicas de cada una) para el experimento GC-NCI-MS.

Se analizaron los extractos por triplicado, obteniéndose recuperaciones en el intervalo 70-110%, cumpliendo así el criterio de la UE de estar entre el 70% y el 120%.

En la Figura 5 se muestran los cromatogramas obtenidos para la disolución mezcla de pesticidas analizada por GC-NCI-MS y GC-EI-MS en modo SIM a 10µg/kg de concentración.

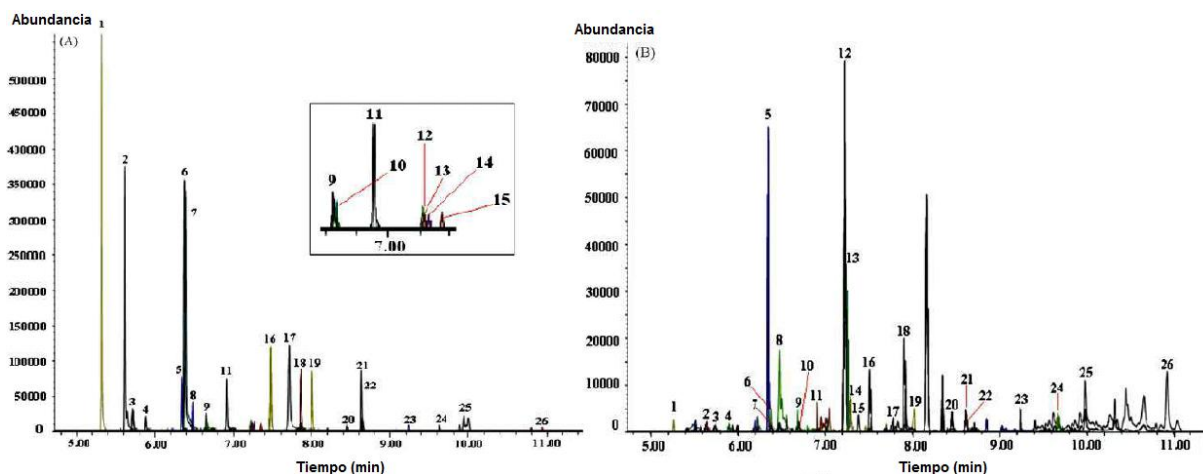


Figura 5. Cromatogramas de los iones objetivo (en negrita en la Tabla 1) de la disolución mezcla de pesticidas sobre blancos de muestras analizadas por GC rápida-MS en modo SIM a 10ng/mL de concentración. (A) Modo NCI. (B) Modo EI. Picos: 3. Dimetoato, 5. Clorpirifós-metilo, 9. Malatión, 13. Diazinón (Húšková et al, 2009).

Como podemos observar, en el modo NCI se obtienen cromatogramas muy limpios, con una gran respuesta del detector comparando con el modo EI al mismo nivel de concentración.

Finalmente, se aplicó el método a muestras reales de naranja, ciruela y fresa para comprobar los resultados que proporcionaba. Se identificó únicamente un pesticida organofosforado, el malatión, en muestras de naranja.

La concentración media de los pesticidas se calculó del análisis por triplicado de dos muestras paralelas, de las áreas de pico absolutas y normalizadas a heptacloro, y las desviaciones estándar relativas para las muestras paralelas (RSD_{PA}) y el análisis GC-MS (RSD_{GC}). En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos de los parámetros evaluados.

Tabla 14. Concentración (C_i , $\mu\text{g}/\text{kg}$) de los residuos de pesticidas analizados en muestras reales y repetibilidad de las medidas expresadas como desviación estándar relativa (RSD , %) (Húšková et al, 2009).

Matriz Pesticida	NCI						EI					
	A_i			A_i/A_{TPP}			A_i			A_i/A_{TPP}		
	C_i	RSD		C_i	RSD		C_i	RSD		C_i	RSD	
		PA	GC		PA	GC		PA	GC		PA	GC
Naranja	50,12	0,5	1,2	51,35	1,1	1,9	52,54	3,5	9,2	52,65	2,6	8,8
Malatión												

En general, se comprueba que los valores de r^2 , LOD, LOQ y RSD son mejores en el modo NCI que en el EI. Esto se debe a la gran selectividad y sensibilidad del modo NCI.

Además, su acoplamiento a GC rápida proporcionó un análisis de residuos de pesticidas rápido a niveles de concentración ultratrazas, consiguiéndose una separación rápida y efectiva con una detección altamente sensible y selectiva.

Por tanto, el método desarrollado es válido para el análisis ultratrazas de residuos de pesticidas, aunque presenta como principal desventaja no disponer de librerías espectrales para los pesticidas, además de requerir que los analitos sean activos en el modo NCI.

En el año 2009, Cunha et al desarrollaron un método para el análisis multiresiduo de pesticidas en uvas por cromatografía de gases rápida de baja presión acoplada a espectrometría de masas (LP-GC/MS), variación de la cromatografía de gases rápida de los dos trabajos de investigación anteriores.

Compararon los resultados obtenidos por GC-MS convencional y LP-GC/MS en la determinación de 27 residuos de pesticidas, de los cuales 14 son organofosforados. Se utilizaron los patrones internos trifenilfosfato (TPP) y malatión-d₆.

Se optimizaron las condiciones de análisis de LP-GC/MS, evaluando la temperatura de la columna, las condiciones de la inyección, el caudal, las condiciones MS, y el efecto matriz para maximizar la sensibilidad y selectividad en la detección y separación de los pesticidas.

Además, una vez se determinaron los tiempos de retención de cada analito en modo *full scan*, se optimizaron las condiciones del modo SIM para obtener una identificación correcta de cada pesticida, un pico cromatográfico con suficiente número de puntos y una buena intensidad de señal. Se seleccionaron 2-3 iones para cada pesticida y un tiempo de permanencia de 15ms, que lograba un mínimo de cuatro puntos de datos a través del pico cromatográfico de cada pesticida. En la Tabla 15 se recogen todos estos parámetros.

Tabla 15. Condiciones MS para el análisis por GC/MS y LP-GC/MS de 27 pesticidas y 2 P.I. (Cunha et al, 2009).

Pesticida	GC/MS			LP-GC/MS			Iones (m/z) en modo SIM
	t _R (min)	S/N	Anchura de pico (s)	t _R (min)	S/N	Anchura de pico (s)	
Mevinfós	4.73	735	4.0	2.44	513	3.9	127 , 192, 224
Ometoato	5.87	706	3.9	2.84	212	4.3	156 , 110, 213
Dimetoato	6.63	1402	2.6	3.10	436	2.4	87 , 125, 229
Diazinón	6.75	1245	2.2	3.19	375	2.1	304 , 137, 273
Clorpirifós-metilo	7.42	2671	2.4	3.39	464	2.3	286 , 125, 323
Malatión-d ₆ (P.I.)	7.74	987	2.8	3.48	758	1.2	173 , 125
Malatión	7.75	852	2.4	3.49	871	1.2	174 , 125
Fentión	7.96	1859	2.2	3.54	510	1.4	278 , 169
Clorpirifós	8.10	1238	2.9	3.55	619	1.8	314 , 199
Clorfenvinfós	8.51	1364	2.5	3.63	1416	1.2	323 , 267
Metidatión	8.92	2644	2.8	3.77	1052	1.7	145 , 302
Etión	10.57	1426	3.8	4.04	891	1.9	231 , 97
TPP (P.I.)	11.36	550	3.5	4.15	250	3.4	326 , 77
Fosmet	12.60	2842	4.4	4.49	1655	4.3	160 , 317
Fosalón	13.61	2857	3.4	4.50	677	4.8	182 , 367
Azinfós-metilo	13.62	3166	3.3	4.68	33	6.8	160 , 132

Como podemos observar, el tiempo de análisis disminuyó con la LP-GC-MS más de 8min con respecto a la GC convencional, incluso se redujo ligeramente la relación señal/ruido (S/N) de los pesticidas sin variar la resolución en comparación con la GC/MS convencional.

Una vez demostrado el efecto matriz existente, para el estudio de la linealidad del método se prepararon las disoluciones del calibrado de cada pesticida en blancos de muestra, a 200µg/mL de concentración para los pesticidas azinfós-metilo, fosalón, fosmet, malatión, y metidatión, 80µg/mL para el etión, y 40µg/mL para el clorpirifós, clorfenvinfós, clorpirifós-

metilo, diazinón, dimetoato, ometoato, fentión y mevinfós.

En cada curva de calibración se incluyeron 5 puntos, siendo el nivel mínimo de calibración 10 veces más bajo que el menor LMR existente para los pesticidas objeto de estudio en la uva. La linealidad fue buena, obteniéndose coeficientes de correlación superiores a 0,9922.

Los pesticidas se extrajeron de las muestras de uva mediante el método QuEChERS, seguido de una limpieza de los extractos por extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE) con los adsorbentes sílice ligada a C₁₈, amina primaria-secundaria (PSA) y MgSO₄ anhidro.

Para los estudios de recuperación y repetibilidad, se fortificaron blancos de muestras de uva con la solución mezcla de patrones de los pesticidas preparada en MeCN, a 3 niveles de concentración en el intervalo 0,02-2,5µg/g, realizando 6 réplicas de cada uno de ellos.

La Tabla 16 recoge los resultados proporcionados por estos estudios, así como los LOD obtenidos para cada pesticida.

Tabla 16. Recuperaciones medias (%), repetibilidad (% RSD) y límites de detección obtenidos con el método QuEChERS en muestras de uva fortificadas analizadas por LP-GC/MS (Cunha et al, 2009).

Pesticida	Conc. fortificada (µg/g)	% Recuperación (% RSD)	Conc. fortificada (µg/g)	% Recuperación (% RSD)	Conc. fortificada (µg/g)	% Recuperación (% RSD)	LOD (ng/g)
Mevinfós	0,04	104 (12)	0,2	64 (16)	0,5	78 (11)	11,0
Ometoato	0,04	66 (17)	0,2	75 (15)	0,5	58 (18)	12,5
Dimetoato	0,04	117 (10)	0,2	63 (19)	0,5	59 (13)	11,0
Diazinón	0,04	80 (6)	0,2	80 (7)	0,5	79 (4)	1,0
Clorpirifós-metilo	0,04	89 (7)	0,2	77 (6)	0,5	74 (6)	1,2
Malatión	0,20	80 (10)	1,0	79 (8)	2,5	74 (4)	4,2
Fentión	0,04	88 (7)	0,2	76 (5)	0,5	74 (7)	3,8
Clorpirifós	0,04	89 (8)	0,2	80 (6)	0,5	78 (6)	3,3
Clorfen-vinfós	0,04	76 (12)	0,2	79 (6)	0,5	77 (6)	3,5
Metidatión	0,20	90 (8)	1,0	65 (15)	2,5	61 (6)	4,0
Etión	0,08	90 (14)	0,4	83 (20)	1,0	66 (6)	1,4
Fosmet	0,20	120 (5)	1,0	63 (11)	2,5	67 (3)	2,2
Fosalón	0,20	96 (6)	1,0	65 (10)	2,5	58 (4)	2,3
Azinfós-metilo	0,20	119 (9)	1,0	64 (13)	2,5	57 (16)	2,0

Se observa que las recuperaciones obtenidas se encuentran entre el 58 y el 120%, con valores de RSD del 3-19%, que cumplen con los requisitos establecidos por la UE.

Por su parte, los LOD se encuentran entre 1,0 y 12,5ng/g, y los LOQ se establecieron como las concentraciones más bajas determinadas con exactitud y precisión aceptables, que fueron los niveles de calibración más bajos en las rectas de calibrado.

Además, se evaluó la robustez del método, obteniéndose resultados satisfactorios.

Luego el método resulta adecuado para la determinación multiresiduo de pesticidas organofosforados en muestras de uva.

Ese mismo año, Hernández-Borges et al desarrollaron un método para la determinación de 10 pesticidas organofosforados en plátanos de Canarias mediante cromatografía de gases

acoplada a un detector nitrógeno-fósforo (GC-NPD). Se utiliza este detector porque todos los pesticidas, incluido el malaoxón (metabolito del malatión), contienen nitrógeno y fósforo.

Las disoluciones de calibrado se prepararon añadiendo los patrones de pesticidas en concentración 150mg/L sobre muestras de plátano libres de pesticidas para minimizar la influencia de las muestras sobre los resultados analíticos. Una vez extraídos los pesticidas en los blancos de muestra mediante el método QuEChERS y limpiados los extractos, se añadió el patrón interno trifenilfosfato (TPP) en concentración 0,64mg/L en el extracto final. En la Figura 6 se observa el cromatograma obtenido para los pesticidas seleccionados y las condiciones operacionales elegidas para el sistema GC-NPD.

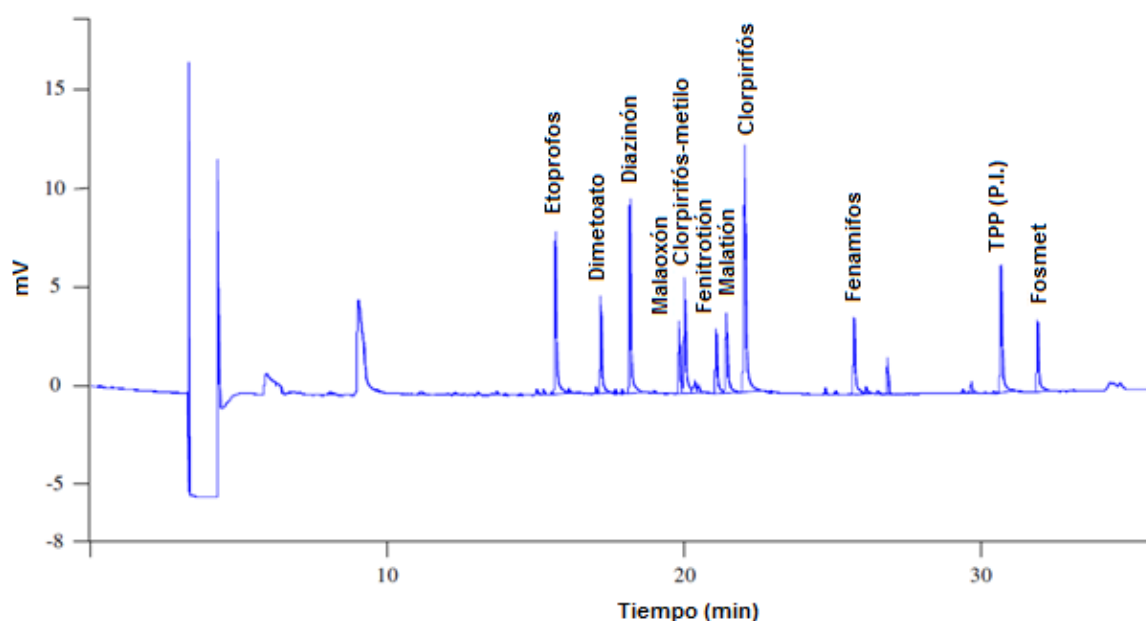


Figura 6. Cromatograma obtenido para los pesticidas analizados por GC-NPD (Hernández-Borges et al, 2009).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 17, donde observamos que los coeficientes de correlación, r^2 , fueron superiores a 0,992 en todos los casos y los LOD se encuentran entre 0,019mg/L para el fenitrotión y 0,082mg/L para el malaoxón.

Tabla 17. Datos de calibración de los pesticidas seleccionados (Hernández-Borges et al, 2009).

Pesticida	t_R (min)	Ecuación de la curva de calibrado	Sy/x	R^2	LOD (mg/L)
Etoprofos	15,68	$y = (2,761x \pm 0,1149) - (0,000 \pm 0,063)$	0,0450	0,999	0,024
Dimetoato	17,13	$y = (1,9018x \pm 0,084) - (0,001 \pm 0,068)$	0,0486	0,999	0,036
Diazinón	18,90	$y = (1,924x \pm 0,050) + (0,001 \pm 0,038)$	0,0273	0,999	0,034
Malaoxón	19,89	$y = (0,785x \pm 0,133) - (0,021 \pm 0,107)$	0,0531	0,992	0,082
Clorpirifós-metilo	19,93	$y = (1,989x \pm 0,097) - (0,026 \pm 0,061)$	0,0405	0,998	0,028
Fenitrotión	20,98	$y = (1,780x \pm 0,068) - (0,008 \pm 0,029)$	0,0194	0,999	0,019
Malatión	21,32	$y = (1,594x \pm 0,075) - (0,026 \pm 0,045)$	0,0296	0,999	0,026
Clorpirifós	21,89	$y = (1,836x \pm 0,156) + (0,030 \pm 0,062)$	0,0411	0,998	0,024
Fenamifos	25,98	$y = (1,696x \pm 0,149) - (0,020 \pm 0,085)$	0,0565	0,996	0,025
Fosmet	32,02	$y = (1,090x \pm 0,144) - (0,051 \pm 0,088)$	0,0436	0,995	0,062

Para estudiar las recuperaciones de los pesticidas, se fortificaron los blancos de muestra

con las disoluciones patrón de pesticidas a 3 niveles de concentración diferentes (0,1, 0,5 y 1,0mg/kg). Los resultados obtenidos y los LOQ del método se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Recuperaciones de los pesticidas en plátanos ($n=5$) (Hernández-Borges et al, 2009).

Pesticida	Recuperación a 0,1mg/kg (RSD, %)	Recuperación a 0,5mg/kg (RSD, %)	Recuperación a 1,0mg/kg (RSD, %)	LOQ (mg/kg)
Etoprofos	116 (8)	91 (10)	95 (8)	0,01
Dimetoato	68 (8)	73 (12)	67 (15)	0,02
Diazinón	115 (9)	100 (10)	109 (7)	0,01
Malaoxón	80 (11)	71 (13)	73 (4)	0,09
Clorpirifós-metilo	81 (9)	70 (10)	76 (7)	0,01
Fenitrotión	116 (8)	118 (9)	112 (4)	0,01
Malatión	101 (9)	91 (9)	81(7)	0,02
Clorpirifós	116 (9)	106 (12)	103 (7)	0,01
Fenamifos	99 (10)	90 (6)	98 (5)	0,02
Fosmet	85 (12)	70 (9)	82 (9)	0,06

Las recuperaciones para los pesticidas estudiados son de 67-118%, con RSDs del 8-15%. Por su parte, los LOQ se sitúan entre 0,01mg/kg y 0,09mg/kg para la malaoxón, por lo que se encuentran por debajo de los LMR establecidos para la mayoría de dichos compuestos.

En cuanto al análisis de muestras reales, se analizaron 57 muestras de plátano recolectadas durante 4 meses en las islas de Tenerife, Gran Canaria, La Palma y El Hierro. Se detectó clorpirifós en 50 muestras, con una concentración de 0,03-0,65mg/kg, malatión en 5 muestras en concentración 0,16-0,17mg/kg, y 0,02-0,10mg/kg de fenitrotión en 4 muestras. El clorpirifós es uno de los pesticidas más utilizados para el tratamiento de plagas en plátanos dada su elevada eficacia, de ahí su alta presencia en las muestras de plátano analizadas. No obstante, en ninguna de ellas superó el LMR establecido (3,00mg/kg), por lo que no presenta ningún problema para la salud pública.

Se investigó también la capacidad de penetración de este pesticida en plátanos, evaluando la cantidad que permanece en la piel de los plátanos y la que penetra la fruta.

Se analizaron mediante el mismo método la pulpa y la piel por separado, realizando por duplicado cada análisis. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Distribución de pesticida clorpirifós en la piel y la pulpa de los plátanos (Hernández-Borges et al, 2009).

Isla	Periodo de muestreo	Concentración de clorpirifós en la piel (mg/kg)	Concentración de clorpirifós en la pulpa (mg/kg)	Relación piel/pulpa
Tenerife	Febrero 2008	0,87 ± 0,02	0,07 ± 0,02	12,40
Tenerife	Febrero 2008	0,22 ± 0,02	0,08 ± 0,03	2,75
Tenerife	Febrero 2008	0,32 ± 0,02	0,10 ± 0,02	3,20
El Hierro	Febrero 2008	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,03	1,22
Tenerife	Febrero 2008	0,44 ± 0,02	0,12 ± 0,02	3,67
La Palma	Marzo 2008	0,27 ± 0,02	0,03 ± 0,02	9,00

Se observa, por tanto, que casi todo el pesticida permanece en la piel de los plátanos.

Finalmente, se concluye que el método es adecuado para la determinación de pesticidas organofosforados en plátanos mediante GC-NPD.

En el año 2009, Ramos et al aplicaron la cromatografía de gases bidimensional (GCxGC) para la determinación de pesticidas en frutas, concretamente naranja, pera, uva y manzana. Utilizaron GCxGC con microdetector de captura electrónica (μ ECD) en combinación con un método de preparación de muestras miniaturizado basado en la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD). Además, estudiaron las ventajas y desventajas que presenta en comparación con la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas con analizador de cuadrupolo (GC-qMS), para lo cual se establecieron la gran mayoría de los parámetros cromatográficos de la forma más parecida posible.

Para la optimización del procedimiento MSPD, se ratificó experimentalmente en base a la bibliografía existente que la utilización de 100mg de muestra con adsorbente C_8 en relación 1:1 (p/p) y 700 μ L de acetato de etilo con un caudal de 0,2mL/min eran suficientes para la extracción cuantitativa de los analitos, siendo el cartucho de extracción secado durante 20min por succión para asegurar la eliminación completa del agua antes de la elución.

Debido al efecto matriz observado, se prepararon las disoluciones de calibrado de los pesticidas sobre blancos de muestra, en el intervalo de concentraciones 0,025-0,50 μ g/mL.

En la Tabla 20 se recogen las recuperaciones obtenidas y las desviaciones estándar relativas, así como el tiempo de retención y los iones identificados para cada analito.

Tabla 20. Tiempo de retención en una columna ZB-5 bajo las condiciones experimentales utilizadas, iones m/z seleccionados para la cuantificación e identificación de los analitos estudiados por GC-qMS, recuperaciones (%) y repetibilidad (RSD, %) obtenidas utilizando el método MSPD. Nivel de fortificación: 0,5 μ g/g (Ramos et al, 2009).

Pesticidas	Tiempo de retención (min)	Iones m/z monitoreados	Recuperación, % (RSD, %)			
			Naranja	Pera	Uva	Manzana
Diclorvos	9.90	109/185	121 (20)	103 (3)	NDa	97 (10)
Mevinfós	12.93	109/127	46 (8)	102 (4)	62 (18)	67 (16)
Dimetoato	18.26	125/143	95 (8)	103 (12)	29 (7)	109 (7)
Diazinón	19.52	152/179	107 (5)	102 (4)	80 (14)	108 (15)
Disulfoton	19.65	125/153	102 (10)	92 (15)	80 (17)	71 (9)
Paratión-metilo	21.05	125/263	113 (17)	93 (15)	88 (8)	121 (10)
Paraoxón-etilo	21.47	109/149	104 (22)	99 (5)	81 (7)	109 (8)
Malatión	22.29	125/173	95 (5)	96 (15)	78 (6)	97 (11)
Clorpirifós-etilo	22.56	125/278	103 (9)	92 (3)	49 (4)	89 (8)
Fentión	22.63	197/314	103 (18)	65 (13)	76 (8)	96 (19)
Paratión-etilo	22.65	139/291	104 (10)	91 (12)	83 (6)	83 (18)
Bromofós-metilo	23.18	125/331	104 (22)	92 (6)	81 (7)	104 (22)
Clorfenvinfós	23.94	267/323	106 (15)	107 (10)	74 (1)	93 (30)
Bromofós-etilo	24.55	303/331	103 (15)	110 (10)	68 (17)	96 (23)
Etión	27.01	153/231	102 (18)	99 (2)	64 (3)	111 (21)

Observamos que las recuperaciones obtenidas en naranjas fueron del 95-113% excepto para el mevinfós y diclorvos, con RSDs por debajo del 20% establecido por la legislación europea en todos los casos menos el paraoxón-metilo y el bromofós-metilo.

Las recuperaciones en muestras de pera proporcionaron muy buenos resultados, en el intervalo 91-110%, con desviaciones estándar relativas por debajo del 15%, excepto para el

fentión, con una recuperación del 65%, como cabía esperar en base a estudios anteriores). En el caso de las uvas, no se analizó el pesticida diclorvos, debido a las elevadas interferencias que presentaba por los componentes de la matriz. La recuperación de los pesticidas fue algo baja (62-88%), pero aceptable debido a las bajas RSDs obtenidas ($\leq 18\%$), excepto para el dimetoato y clorpirifós-metilo (29% y 49%, respectivamente). Finalmente, para las manzanas se obtuvieron buenas recuperaciones de pesticidas organofosforados (71-121%, 67% para el mevinfós), pero con peor precisión comparada con las otras frutas analizadas, llegando hasta el 30% de RSD para el clorfenvinfós. Esto puede deberse a la eliminación del paso de limpieza en el pretratamiento de muestras de manzana.

Para la optimización del sistema GCxGC- μ ECD, se evaluaron 6 combinaciones de columnas con diferentes polaridades. Se escogieron, en función de las curvas de calibración obtenidas, ZB-5 y BPX-50 como columnas cromatográficas del sistema GCxGC- μ ECD.

La Figura 7 muestra el fragmentograma GC-qMS reconstruido y el cromatograma bidimensional obtenido del análisis de muestras reales de uva pretratadas según el procedimiento de extracción miniaturizado propuesto. En ellas, se puede observar el poder de separación que proporciona la técnica GCxGC- μ ECD, a pesar de ser el μ ECD un detector no selectivo, así como los buenos resultados que se obtienen utilizando GC-qMS.

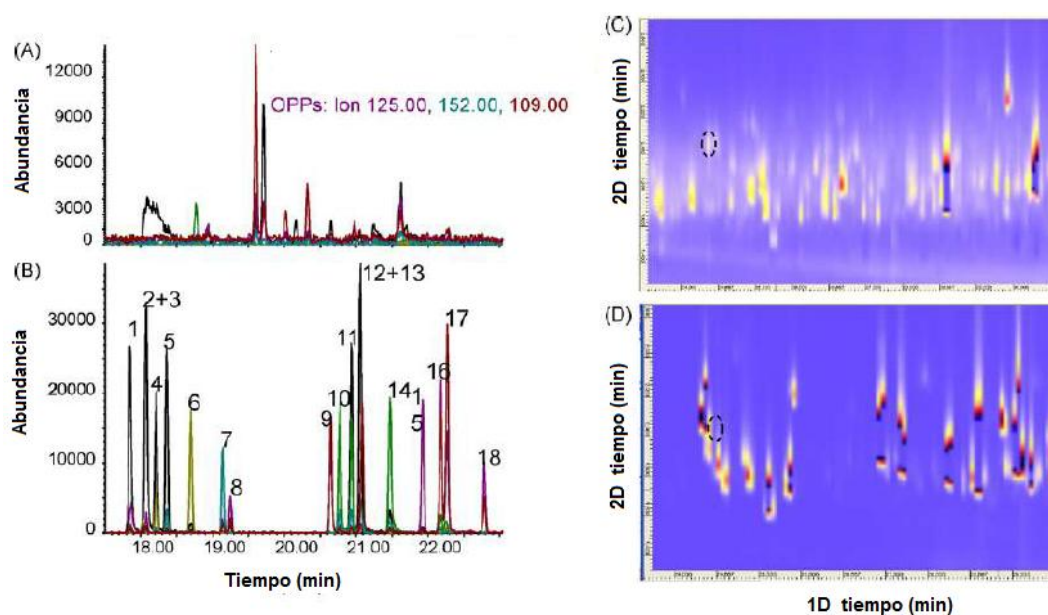


Figura 7. Zoom de un área seleccionada de cromatogramas típicos obtenidos por GC-qMS (scan) utilizando columnas ZB5 para (A) uva no fortificada y (B) disolución mezcla de pesticidas a 0,5mg/kg de concentración, y por GCxGC- μ ECD utilizando combinación de columnas ZB5 x PBX50 para (C) el mismo extracto de uva y (D) mezcla de pesticidas. Picos: 7. Diazinón, 8. Disulfotón, 9. Paratión-metilo, 13. Paraoxón-etilo, 15. Malatión, 16. Clorpirifós-etilo, 17. Fentión, 18. Bromofós-metilo (Ramos et al, 2009).

Un beneficio extra de la utilización de la técnica GCxGC- μ ECD es su alta sensibilidad, como reflejan los LODs obtenidos para cada pesticida para muestras de naranja reales después

del tratamiento de muestra miniaturizado, que se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Comparación de LODs ($\mu\text{g}/\text{kg}$) calculados para naranja después de la preparación de las muestras y su análisis por GC-qMS en modo SIM y GCxGC- μECD (Ramos et al, 2009).

Pesticida	GC-qMS	GC x GC- μECD
Diclorvos	83	0,046
Mevinfós	35	0,071
Dimetoato	100	0,065
Diazinón	94	0,120
Disulfoton	150	1,100
Paratión-metilo	86	0,015
Paraoxón-etilo	250	0,085
Malatión	47	0,020
Clorpirifós-etilo	15	0,005
Fentión	69	0,560
Paratión-etilo	200	NDa
Bromofós-metilo	86	0,018
Clorfenvinfós	86	1,000
Bromofós-etilo	47	1,200
Etión	46	0,060

Los LODs obtenidos por GCxGC- μECD (0,005-1,20 $\mu\text{g}/\text{kg}$), calculados como 3 veces la S/N, son muy inferiores a los correspondientes al sistema GC-qMS (15-250 $\mu\text{g}/\text{kg}$), y también mucho más bajos de los LMR establecidos por la legislación. Además, se utilizan pequeñas cantidades de muestra y un consumo de disolvente mínimo (700 μL de acetato de etilo). Todo ello prueba la idoneidad del método descrito para la determinación de pesticidas organofosforados en frutas como la pera, la uva, la manzana y la naranja.

En el año 2010, Menezes Filho et al publicaron un método basado en la microextracción en fase sólida (SPME) y la determinación por GC-MS de 14 residuos de pesticidas en mango, entre los que destacan los organofosforados diazinón, paratión-metilo, malatión y fentión.

Dada la diferente polaridad de los analitos, se evaluaron varias fibras para optimizar la eficiencia en la extracción mediante SPME en un soporte diseñado para el uso de un inyector automático. Para asegurar la determinación del mayor número de compuestos posible, las extracciones se realizaron en el modo de inmersión directa (DI-SPME).

En la Figura 8 observamos el número de pesticidas extraídos en función del tipo de fibra utilizado, además de las áreas de pico promedio obtenidas para cada fibra.

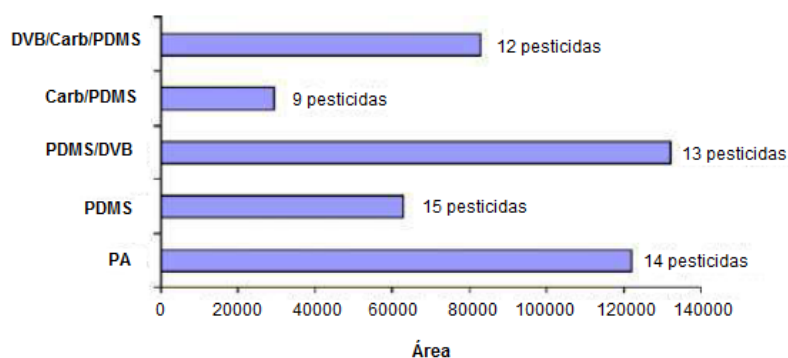


Figura 8. Eficiencia de cada fibra en la extracción de pesticidas por DI-SPME (Menezes Filho et al, 2010).

Se observa que las fibras menos eficientes fueron las que contenían carboxen. Se escogió la de poliacrilato (PA) por extraer el mayor número de pesticidas, los 14 objeto de estudio. Después, se utilizó la fibra de poliacrilato para evaluar los modos en SPME: modo de inmersión de fibra directa (considerada en estudios anteriores más sensible) y modo de espacio de cabeza (HS-SPME). En la Figura 9 aparecen los resultados obtenidos.

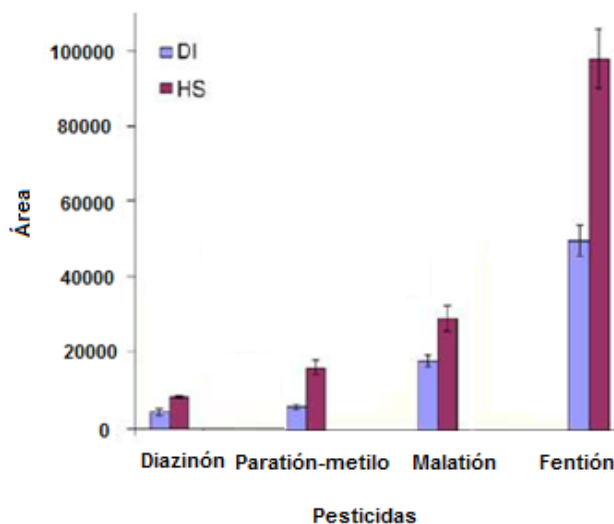


Figura 9. Eficiencias de extracción SPME en el modo de inmersión de fibra directa (DI) y el de espacio de cabeza (HS) (Menezes Filho et al, 2010).

El modo de espacio de cabeza permitía extracciones más eficientes de los compuestos más volátiles, como los pesticidas organofosforados, pero no extraía de manera satisfactoria los de menor volatilidad, por lo que los autores eligieron la inmersión de fibra directa (DI-SPME), perdiendo sensibilidad en el caso de los pesticidas organofosforados.

También se evaluó el tiempo y la temperatura del inyector, ya que la completa desorción de los analitos de la fibra aumenta la respuesta del detector y elimina los efectos de memoria, obteniéndose los mejores resultados a los 5min y 280°C.

Para reducir el efecto matriz provocado por las muestras de mango, se evaluaron varias combinaciones de disolventes de extracción, tales como agua pura, agua:etanol (80:20), agua:alcohol isopropílico (80:20) y agua:acetronitrilo (80:20), obteniéndose los mejores resultados en el segundo caso.

También se estudiaron la temperatura de extracción, escogiéndose la de 50°C por presentar la mejor señal analítica para la mayoría de compuestos, el tiempo de extracción requerido para alcanzar el equilibrio en la fibra de la fase estacionaria, la solución de muestra y los pesticidas (30min), la velocidad de agitación (250rpm), la fuerza iónica y el pH (3).

Para la construcción de las curvas de calibrado, se analizaron por triplicado cada una de las nueve concentraciones de pesticidas estudiadas en las mismas. La Tabla 22 muestra los coeficientes de correlación, LOD y LOQ obtenidos para cada pesticida, así como los LMR

establecidos para los mismos en muestras de mango.

Tabla 22. Coeficiente de correlación, LOD, LOQ y LMR de los pesticidas estudiados (Menezes Filho et al, 2010).

Pesticida	Ecuación de la recta de regresión	r ²	Intervalo lineal (µg/kg)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	LMR (µg/kg)
Diazinón	39,58x - 5,217	0,9987	16,65-1665,00	5,00	16,65	10,00
Paratión-metilo	453,69x - 12124	0,9960	16,65-1665,00	5,00	16,65	10,00
Malatión	395,65x - 22928	0,9907	6,66-1665,00	2,00	6,66	20,00
Fentión	3917,3x + 165795	0,9966	3,33-1665,00	1,00	3,33	10,00

Los coeficientes de correlación oscilan entre 0,9907 y 0,9987, demostrando la linealidad del método. Los LOD y LOQ obtenidos, 1,00-5,00µg/kg y 3,33-16,65µg/kg respectivamente, reflejan la sensibilidad del método. Además, los LOD se encuentran por debajo de los LMR establecidos, luego el método es adecuado para el objetivo propuesto con el mismo.

Se evaluó la precisión del método como repetibilidad, realizando 7 extracciones de muestra en el mismo día y la reproducibilidad, realizando 3 extracciones al día durante 5 días. Los coeficientes de variación (RSD, %) se muestran en la Tabla 23, siendo inferiores al 10,88% en el primer caso, e inferiores al 13,69% en el segundo. Luego el método es preciso.

Tabla 23. Repetibilidad y reproducibilidad del método DI-SPME desarrollado (Menezes Filho et al, 2010).

Pesticide	RSD (%) de la concentración fortificada (50µg/kg)	
	En el mismo día, n=7 (Repetibilidad)	En días consecutivos, n=15 (Reproducibilidad)
Diazinón	4,04	13,69
Paratión-metilo	6,71	11,52
Malatión	10,88	12,96
Fentión	8,33	7,04

Las recuperaciones promedio obtenidas en blancos de muestras de mango a los 3 niveles de concentración enriquecida (33,33, 166,50 y 333,33µg/kg) se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24. Recuperaciones medias relativas y RSD(%) del método DI-SPME (Menezes Filho et al, 2010).

Pesticidas	Nivel de concentración (µg/kg)	Recuperación media (%)	RSD (%)
Diazinón	33,33	117,52	12,33
	166,50	89,48	4,56
	333,33	77,35	6,68
Paratión-metilo	33,33	91,85	7,60
	166,50	82,03	6,75
	333,33	68,93	3,73
Malatión	33,33	83,87	4,85
	166,50	75,34	5,72
	333,33	72,05	6,04
Fentión	33,33	75,81	5,93
	166,50	72,39	4,11
	333,33	52,25	3,93

Se observa que las recuperaciones se encuentran en el intervalo 75,81-117,52% para la concentración más baja (33,33µg/kg) y el 52,25-77,35% para la concentración más alta.

Finalmente, para determinar la aplicabilidad del método, se analizaron por triplicado 16

muestras de mango comerciales, introduciendo un blanco de fibra cada dos muestras para comprobar la ausencia de efectos de arrastre. La Tabla 25 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 25. Concentraciones de pesticidas determinados para 16 muestras de mango (Menezes Filho et al, 2010).

Pesticidas	Concentración de pesticidas ($\mu\text{g}/\text{kg}$) (RSD (%), $n=3$)															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Diazinón	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Paratión-metilo	43,14 (3,74)	40,81 (4,78)	n.d.	n.d.	37,43 (4,21)	n.d.	n.d.	31,95 (2,68)	n.d.	41,80 (3,42)	n.d.	57,88 (4,18)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Malatión	47,90 (2,16)	n.d.	43,65 (3,04)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	48,58 (4,07)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fentión	4,46 (0,86)	3,80 (0,61)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,98 (1,04)	n.d.	n.d.	n.d.

Se detecta paratión-metilo en seis de las muestras analizadas, con concentración inferior a $57,88\mu\text{g}/\text{kg}$ y RSD inferior a 4,78%. El malatión solo se detecta en tres muestras en concentración menor o igual a $48,58\mu\text{g}/\text{kg}$ y RSD inferior al 4,46%. El fentión únicamente se detecta en tres muestras por debajo de $6,98\mu\text{g}/\text{kg}$ y $\text{RSD} \leq 1,04\%$.

En 8 de las muestras analizadas no se detectó ninguno de los pesticidas organofosforados analizados. El diazinón, de hecho, no se detecta en ninguna de las muestras.

El método es sensible y selectivo, y permitió la determinación de residuos de pesticidas organofosforados de manera precisa y con buenas recuperaciones, así como con límites de cuantificación por debajo del LMR permitido por la legislación. Se concluye, por tanto, que el método basado en DI-SPME seguida de análisis por GC-MS puede ser aplicado para la determinación cualitativa y cuantitativa de residuos de pesticidas en mangos.

En 2010, Guan et al desarrollaron un método de análisis multirresiduo de 19 pesticidas, entre los que se encuentra el organofosforado clorpirifós-etilo, en frutas y vegetales utilizando extracción con pipeta desechable (DPX), el Método Micro-Luke, y la cromatografía de gases acoplada al detector de captura electrónica (ECD) y el de nitrógeno-fósforo (NPD).

El Método Micro-Luke utiliza acetona como disolvente de extracción de las muestras y puede utilizarse con varios sistemas GC, con detectores tanto selectivos como no selectivos. Su mayor ventaja es su capacidad de proporcionar recuperaciones cuantitativas de los pesticidas y que, después de la limpieza de los extractos con Florisil, se reduce mucho el efecto matriz.

No obstante, requiere un gran consumo de tiempo debido a los múltiples pasos de concentración de disolvente necesarios. Además, utiliza para cada muestra unos 375mL de disolventes orgánicos, tales como cloruro de metileno o éter de petróleo.

Por su parte, en la DPX la muestra se mezcla con el adsorbente, contenido dentro de la punta de una pipeta desechable, de manera dispersiva para proporcionar un rápido

equilibrio y adsorción del analito con el adsorbente. Proporciona una mayor velocidad de extracción que la SPE, de la que deriva, y menor necesidad de evaporación del disolvente.

Para la validación del método DPX, se analizaron datos de calibración tales como el coeficiente de correlación, el LOD y el LOQ.

Para reducir o eliminar el efecto matriz, la calibración externa se realizó con blancos de muestras fortificadas con clorpirifós-etilo a cinco niveles de concentración en el rango 0,1-2,0ppm, realizado varias réplicas a cada nivel de concentración. Previamente, utilizando el método de Luke, se confirmó la ausencia de pesticida en la muestra.

Por su parte, para la recuperación y la precisión (expresada como RSD, en %), se utilizaron 5 muestras de mandarina fortificadas con clorpirifós-metilo en concentración 0,5ppm.

Los resultados obtenidos fueron: coeficiente de correlación de 0,9929 (buena linealidad del método), LOD y LOQ de 0,077ppm y 0,233ppm, respectivamente (inferiores al LMR de 0,3ppm), recuperación del $91,5 \pm 3,9\%$ (dentro del intervalo 70-120% requerido) y RSD del 4,0%, por lo que el método es válido para el análisis propuesto.

El método micro-Luke utilizado para el análisis de pesticidas polares, combinado con DPX, fue comparado directamente con el método de Luke modificado para el análisis de muestras durante un periodo de 9 semanas. La Tabla 26 muestra las concentraciones de pesticidas determinadas utilizando los métodos Luke y DPX y la técnica GC-ECD en varias muestras. Se obtuvo un coeficiente de correlación entre 0,9868 y 0,9565 para todos los pesticidas. Resultados análogos se muestran en la Tabla 27 con los métodos de Luke y Micro-Luke y la técnica GC-NPD. En este caso, el coeficiente de correlación fue de 0,9827, indicando buena relación entre los métodos Luke y micro-Luke.

Tabla 26. Pesticidas en frutas mediante los métodos DPX y Luke y el análisis por GC-ECD (Guan et al, 2010).

Muestra	Pesticida	Conc. pesticida por el método Luke (ppm)	Conc. pesticida por el método Micro-Luke (ppm)	LMR (mg/kg)
Uvas rojas	Clorpirifós-etilo	0,1400	0,2000	-
Melocotones	Fosmet	0,1700	0,3200	1,00
Albaricoques	Fosmet	0,0900	0,2000	0,05
Arándanos	Malatión	0,0750	0,1220	0,02
Manzanas	Azinfós-metilo	-	0,2243	0,05
Melocotones	Fosmet	0,2460	0,4410	1,00
Melocotones	Fosmet	0,0900	0,2800	1,00
Fresas	Malatión	-	0,0560	0,02
Melocotones	Fosmet	0,1200	0,1800	1,00

Tabla 27. Concentraciones de pesticidas en muestras de frutas determinados utilizando los métodos Luke y Micro-Luke y el análisis mediante GC-NPD (Guan et al, 2010).

Muestra	Pesticida	Conc. pesticida por el método Luke (ppm)	Conc. pesticida por el método Micro-Luke (ppm)	LMR (mg/kg)
Arándanos	Malatión	0,1360	0,1880	0,02
Manzanas	Azinfós-metilo	0	0,3652	0,05
Melocotones	Fosmet	0,0758	0,0858	1,00

Se desarrolla, por tanto, un método rápido, simple y fiable para la extracción de pesticidas organofosforados en frutas y vegetales. El método de extracción DPX alivia la tediosa preparación de muestras, especialmente comparado con el método de Luke.

Además, el método micro-Luke combinado con la DPX permite el análisis multiresiduo de pesticidas utilizando acetona de manera rápida y eficiente.

La misma autora publica el mismo año un método para el análisis de pesticidas en frutas y vegetales utilizando también la extracción DPX y la técnica GC-MS. Determinan hasta 39 pesticidas en muestras de naranja, siendo 17 organofosforados.

Se utilizan mecanismos de fase inversa (DPX-RP), que resultan muy útiles para la extracción de pesticidas no polares o de baja polaridad, con carbono negro grafitado (GCB), amina primaria-secundaria (PSA) y sulfato de magnesio ($MgSO_4$) como adsorbentes.

Se preparó una solución mezcla de pesticidas sobre naranjas sin tratar, a 5 niveles de concentración en el intervalo 0,1-2,0 μ g/mL y realizando varias réplicas en cada nivel.

El LOD y el LOQ se calcularon como la concentración de analito igual a 5 y 10 veces la relación señal/ruido del ion objetivo, respectivamente. En la Tabla 28 se muestran los resultados obtenidos para la calibración del método.

Tabla 28. Coeficiente de correlación, LOD y LOQ de los pesticidas estudiados utilizando el método DPX-RP (Guan et al, 2010).

Pesticida	r^2	LOD (μ g/g)	LOQ (μ g/g)
Bolstar	0,998	0,0022	0,0043
Clorpirifós	1,000	0,0020	0,0040
Cumafós	0,998	0,0139	0,0278
Demetón-S	1,000	0,0013	0,0026
Diazinón	1,000	0,0025	0,0050
Diclorvos	0,997	0,0083	0,0167
Disulfotón	0,998	0,0025	0,0050
Etoprofos	0,999	0,0028	0,0056
Fentión	1,000	0,0005	0,0011
Fensulfotión	0,999	0,0025	0,0050
Paratión-metilo	0,998	0,0100	0,0200
Mevinfós	0,999	0,0052	0,0104
Forato	0,999	0,0008	0,0017
Ronel	1,000	0,0003	0,0006
Estirofos	0,996	0,0021	0,0042
Tokution	0,998	0,0009	0,0018
Tricloronato	0,999	0,0009	0,0018

Se observa que los coeficientes de correlación obtenidos de las curvas de calibración son superiores a 0,997 para todos los pesticidas, reflejando la linealidad del método.

Los límites de detección y cuantificación obtenidos son inferiores a 0,01 μ g/g y 0,0167 μ g/g excepto en el caso del cumafós con LOD de 0,0139 μ g/g y LOQ de 0,0278 μ g/g.

La etapa inicial de la preparación de las muestras es idéntica al procedimiento seguido por el método QuEChERS. Después, se aplica la extracción DPX.

En el caso de los pesticidas polares, se añadió agua desionizada en los extractos originales para reducir el porcentaje de disolvente orgánico, y aumentar así la retención en la solución de muestra para mejorar las recuperaciones de dichos pesticidas.

Para el estudio de la recuperación mediante DPX-RP, se fortificaron blancos de muestras con concentraciones conocidas de los pesticidas, realizando cuatro réplicas de las mismas, para reducir o eliminar interferencias propias de la matriz.

Todos los cálculos se realizaron en base a las relaciones de área de pico de los analitos y los patrones externos.

Se evaluó la elución de los pesticidas desde la parte superior y la inferior de la punta de la pipeta, comprobándose que era un 15% mayor en el primer caso, por lo que se seleccionó dicha opción. En un solo paso se consigue la extracción y el intercambio de disolvente.

En la Tabla 29 se muestran las recuperaciones de los pesticidas obtenidas en naranjas.

Tabla 29. Recuperaciones y RSD (%) obtenidas utilizando DPX-RP para el análisis de residuos de pesticidas en naranjas (Guan et al, 2010).

% Recuperación de pesticidas en naranjas (% RSD)									
Pesticida	Bolstar	Clorpirifós	Cumafós	Demeton-S	Diazinón	Diclorvos	Disulfotón	Etoprofos	Fentión
Recuperación	89,7 (0,2)	92,9 (0,7)	98,7 (1,5)	76,0 (1,2)	93,4 (1,4)	41,0 (1,8)	94,4 (1,5)	88,6 (2,0)	96,1 (0,7)
Pesticida	Fensulfotión	Paratión-metilo	Mevinfós	Forato	Ronel	Estirofos	Tokution	Tricloronato	
Recuperación	77,3 (1,9)	95,6 (1,2)	20,7(2,2)	101,7 (1,5)	96,2 (1,2)	100,6 (2,4)	82,6 (0,9)	88,2 (0,6)	

Se observa cómo las recuperaciones son muy bajas en el caso de pesticidas con cierta polaridad como el diclorvos y el mevinfós (41% y 20,7%, respectivamente).

La adición de agua desionizada al extracto en acetonitrilo original aumentó dichas recuperaciones hasta valores aceptables, pero resultó inútil en pesticidas muy polares como el acefato y metamidofós. Para el resto de pesticidas apolares, las recuperaciones obtenidas en muestras de naranja fueron del 76%-101,7%.

Por su parte, las desviaciones estándar relativas obtenidas fueron inferiores al 2,4%, lo que denota la gran repetibilidad del método.

Además, los LOD y LOQ obtenidos para todos los pesticidas se encuentran muy por debajo de los LMR establecidos, por lo que el método propuesto es válido para la determinación multirresiduo de pesticidas organofosforados en frutas cítricas como la naranja.

La extracción DPX-RP ha mostrado ciertas ventajas, tales como: eficiencia en la extracción de plaguicidas poco polares y no polares debido a la naturaleza hidrofóbica del adsorbente DPX-RP, rapidez, alto rendimiento, sensibilidad, selectividad, mayor reproducibilidad y posible automatización fácilmente alcanzable. Además, no requiere evaporación de disolvente ni concentración adicional o paso de intercambio de disolvente. Sin embargo, presenta como gran inconveniente no ser válida para el análisis de pesticidas muy polares.

Savant et al desarrollaron en 2010 un método de análisis multiresiduo de 50 pesticidas, 11 de ellos organofosforados, en uva, granada y mango por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas tándem (GC-MS/MS) con analizador de trampa de iones.

Se analizaron los blancos de muestra para minimizar lo máximo posible los falsos positivos, analizando por duplicado aquellas muestras con detección positiva de pesticidas, y se optimizaron varios parámetros del sistema GC-MS/MS, tales como el proceso de vaporizador de temperatura programada-inyección de gran volumen (PTV-LVI), el tipo de recubrimiento, la longitud de la columna, y las condiciones cromatográficas, para obtener la mayor relación S/N para todos los pesticidas.

El sistema MS/MS se optimizó en 3 pasos: aislamiento del ion precursor, excitación del ion, y disociación en iones producto. Para la cuantificación de todos los compuestos, se utilizó el ion característico de mayor intensidad, y el siguiente ion más intenso para la confirmación.

Para garantizar la máxima relación S/N, el rango de escaneo de iones se mantuvo lo más estrecho posible. Se utilizó la relación de transiciones reacciones múltiples monitoreadas (MRM) de confirmación/cuantitativas para la identificación inequívoca de los pesticidas detectados en muestras reales dentro del 20% de rango de tolerancia en el LOQ.

Para la validación del método, se evaluaron el efecto matriz, la linealidad, la sensibilidad, la recuperación de pesticidas, y la repetibilidad. Se comprobó que el efecto matriz era menor en el caso de las uvas para casi todos los compuestos, debido a las diferentes composiciones bioquímicas de las frutas analizadas y la influencia de los compuestos coextraídos en el proceso de ionización de los analitos (polifenoles, ácidos grasos, etc.).

El acoplamiento de espectrómetros de masas resolvió el problema de coelución de los compuestos difíciles de separar cromatográficamente en el modo full scan.

Se obtuvieron coeficientes de correlación superiores a 0,99 para las curvas de calibración obtenidas, tanto para los patrones de calibrado en disolvente como en blanco de muestra.

Las recuperaciones obtenidas se encuentran en el rango 70-99%, 74-108% y 70-98% para la uva, la granada y el mango, respectivamente, con RSDs inferiores al 18%.

Además, los LOQ obtenidos para las 3 matrices son inferiores a los LMR establecidos para los pesticidas estudiados en dichas muestras. La Tabla 30 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 30. Recuperaciones (%) y LOQ de los pesticidas analizados en uva, granada y mango (Savant et al, 2010).

Pesticida	Recuperación en uva (±RSD%, n=6)				Recuperación en granada (±RSD%, n=6)				Recuperación en mango (±RSD%, n=6)			
	10 ng/g	20 ng/g	50 ng/g	LOQ (ng/g)	10 ng/g	20 ng/g	50 ng/g	LOQ (ng/g)	10 ng/g	20 ng/g	50 ng/g	LOQ (ng/g)
Diclorvos	85 (±18)	77 (±12)	71 (±3)	5,5	108 (±11)	99 (±7)	102 (±1)	4,5	93 (±7)	87 (±8)	76 (±6)	6,5
Forato	83 (±12)	93 (±4)	89 (±2)	5,2	91 (±10)	81 (±4)	100 (±7)	6,2	102 (±8)	84 (±5)	89 (±8)	5,9

Tabla 30 (continuación)

Pesticida	Recuperación en uva (±RSD%, n=6)				Recuperación en granada (±RSD%, n=6)				Recuperación en mango (±RSD%, n=6)			
	10 ng/g	20 ng/g	50 ng/g	LOQ (ng/g)	10 ng/g	20 ng/g	50 ng/g	LOQ (ng/g)	10 ng/g	20 ng/g	50 ng/g	LOQ (ng/g)
Diazinón	86 (±15)	88 (±11)	88 (±4)	6,4	82 (±10)	81 (±4)	100 (±7)	6,5	88 (±9)	87 (±2)	89 (±1)	7,5
Clorpirifós- metil	82 (±8)	77 (±5)	76 (±5)	5,0	75 (±10)	96 (±8)	95 (±7)	6,5	79 (±9)	76 (±6)	88 (±5)	5,0
Paratión metilo	99 (±6)	79 (±10)	73 (±8)	5,5	85 (±11)	80 (±13)	100 (±8)	6,5	70 (±12)	75 (±15)	86 (±9)	5,6
Fenitrotión	86 (±15)	89 (±9)	85 (±4)	6,2	84 (±16)	83 (±10)	90 (±4)	6,8	80 (±14)	86 (±9)	81 (±3)	7,6
Clorpirifós- etilo	76 (±8)	83 (±7)	76 (±3)	6,5	76 (±6)	89 (±2)	90 (±3)	5,3	87 (±8)	83 (±6)	82 (±4)	5,2
Paratión- etilo	81 (±12)	77 (±10)	75 (±7)	9,0	85 (±3)	96 (±10)	89 (±9)	6,0	86 (±18)	80 (±15)	88 (±7)	8,0
Clorfen- vinfós	79 (±14)	83 (±4)	79 (±3)	6,0	78 (±11)	84 (±10)	83 (±6)	6,2	74 (±7)	78 (±7)	90 (±4)	6,4
Profenofos	90 (±10)	95 (±6)	84 (±4)	5,0	79 (±5)	74 (±7)	84 (±4)	5,0	79 (±12)	70 (±5)	70 (±7)	5,2
Fosalón	70 (±14)	74 (±5)	77 (±4)	5,5	101 (±6)	87 (±4)	109 (±5)	5,6	71 (±4)	74 (±12)	98 (±5)	6,2

El método optimizado se aplicó a la identificación de pesticidas en muestras reales de uva, granada y mango, detectándose únicamente clorpirifós en granada con una concentración de 0,02mg/kg, por debajo del LMR establecido para dicho pesticida.

Utilizando GC-MS en modo full scan solo se podía realizar una detección cualitativa, la cuantificación no era posible por la pobre figura del pico y la incertidumbre del área de pico. Esto demuestra una selectividad y sensibilidad superior en la espectrometría de masas en tándem analizando residuos de pesticidas a nivel de trazas en muestras agroalimentarias.

El método desarrollado es eficiente, robusto y potente para su aplicación en el monitoreo del cumplimiento de los LMR de una amplia gama de combinaciones de productos y pesticidas.

En el año 2011, Satpathy et al desarrollaron un novedoso método para el análisis multiresiduo de 72 pesticidas en 35 tipos de frutas y verduras por extracción asistida por microondas (MAE), limpieza de los extractos por extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE), y determinación por GC-MS.

Mediante este método se analizan 25 pesticidas organofosforados en muestras de plátano, papaya, granada, pera, chirimoya, uva, ciruela, mango, manzana y naranja.

Se optimizaron las condiciones de la extracción y de la etapa de limpieza de extracto, seleccionándose como disolvente de extracción acetona:acetonitrilo (50:50) debido a su buena propiedad de absorción de microondas y alta selectividad hacia los analitos de interés. Además, a las frutas no cítricas se les añadió ácido acético porque aumentaba la

recuperación de ciertos pesticidas que resultan más estables a pH bajo (4-7).

La humedad de las frutas, superior al 80%, hace que aumente la polaridad del disolvente de extracción y la eficiencia de la capacidad de absorción de microondas, facilitando el proceso de calentamiento, así como la disponibilidad de los analitos para el disolvente de extracción. Esto ocurre gracias a que el agua que contienen es calentado localmente, siendo un factor importante para aumentar la recuperación de los pesticidas.

Para la limpieza de los extractos por d-SPE, se utiliza como adsorbente amina primaria/secundaria (PSA) porque tiene mayor capacidad iónica para eliminar ácidos grasos, que provocan ensanchamiento y solapamiento de picos cromatográficos interfiriendo en la determinación de pesticidas. Se utilizó sulfato de magnesio para eliminar el agua residual.

La cuantificación de los pesticidas se realizó con el espectrómetro de masas en modo SIM en el pico molecular (m/z) con un tiempo de permanencia de 25ms, entre otros parámetros.

La linealidad del método, expresada como coeficiente de correlación (r^2), se obtuvo mediante el análisis por regresión lineal de mínimos cuadrados del área de pico obtenida frente a la correspondiente concentración de analito, analizando por triplicado 7 niveles de concentración en el intervalo 0,025-0,5mg/kg. El LOD y el LOQ del método se establecieron analizando 20 réplicas de cada blanco de muestra.

Los estudios de repetibilidad se llevaron a cabo a 3 niveles de concentración y 6 réplicas para cada concentración en el mismo día, mientras que los de reproducibilidad se realizaron también a 3 niveles de concentración, una vez al día durante 5 días consecutivos.

También se evaluó la robustez del método, variando el tiempo de extracción o retrasando un día el análisis después de finalizar el procedimiento de extracción, y las recuperaciones de pesticidas obtenidas de las muestras fortificadas. La Tabla 31 recoge estos resultados.

Tabla 31. Tiempo de retención, límite de detección, límite de cuantificación, coeficiente de regresión (r^2), recuperaciones (%) (RSD, %), repetibilidad y reproducibilidad de los pesticidas estudiados (Satpathy et al, 2011).

Pesticida	Tiempo de retención (min)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	r^2	% Recuperación	Precisión (Repetibilidad)	Reproducibilidad	
Mevinfós	7,102	0,006	0,025	1,00	89(7,3)	10,1	16,1	20,9
Triclorfón	7,673	0,007	0,025	1,00	85(6,4)	9,8	17,8	20,2
Ometoato	10,025	0,005	0,025	0,99	99(5,7)	9,8	16,7	21,8
Monocrotofós	11,236	0,008	0,025	1,00	91(6,9)	3,5	7,9	20,9
Forato	11,549	0,007	0,025	1,00	97(11,2)	9,1	17,1	23
Tiometón	11,996	0,004	0,025	1,00	113(11,7)	3,1	12,1	22,6
Dimetoato	12,332	0,004	0,025	1,00	104(13,6)	3,5	12,5	21,1
Diazinón	14,367	0,060	0,025	1,00	102(7,4)	11,2	17,2	20,9
Fosfamidón	14,502	0,007	0,025	0,99	112(16,3)	11,8	17,8	23,8
Formotión	15,427	0,007	0,025	1,00	91(10,1)	6,8	15,9	21,5
Paratión-metilo	16,569	0,006	0,025	1,00	99(11,3)	2,9	18	21,5
Clorpirifós-metilo	16,657	0,006	0,025	1,00	98(11,2)	8,8	16,6	21,9
Fenitrotión	18,112	0,005	0,025	1,00	103(9,7)	8,2	18,2	21,5
Malatión	18,831	0,006	0,025	1,00	114(2,4)	8,9	16,8	23,4
Fentión	19,200	0,005	0,025	0,99	82(7,2)	7,8	15,9	22

Tabla 31 (continuación)

Pesticida	Tiempo de retención (min)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	r ²	% Recuperación	Precisión (Repetibilidad)	Reproducibilidad	
Paratión	19,347	0,005	0,025	1,00	81(4,5)	7,9	14,7	22,6
Clorpirifós	19,348	0,004	0,025	1,00	88(10,1)	7,5	12,6	23,4
Clorfenvinfós a	20,984	0,005	0,025	0,99	93(10,9)	8,9	16,7	24,3
Clorfenvinfós b	21,598	0,005	0,025	1,00	99(11,3)	3,4	12,6	21,6
Quinalfos	21,909	0,007	0,025	1,00	91(10,1)	8,7	15,7	23,8
Jodfenfos	22,648	0,007	0,025	1,00	77(11,0)	5,8	14,8	24,5
Profenofos	23,968	0,005	0,025	1,00	95(9,3)	4,6	14,2	24,1
Etión	26,014	0,007	0,025	0,99	92(10,8)	7,9	15,8	21,9
Triazofos	26,321	0,006	0,025	1,00	92(10,5)	9,4	16,9	25
Fosalón	29,443	0,007	0,025	0,99	97(10,7)	11,8	17,5	23,7

Se obtienen buenos coeficientes de correlación y por tanto, el método es lineal ($r^2 = 0,993-0,999$), LODs y LOQs (0,004-0,06 y 0,025mg/kg, respectivamente) por debajo de los LMR establecidos, buenas recuperaciones de pesticidas en las muestras (77-114%), repetibilidad y reproducibilidad dentro de los requerimientos de RSD menor del 20%, con RSDs inferiores a 11,8% y 18,2%, respectivamente. Por tanto, el método es robusto.

Se realizó además un estudio de intercomparación entre laboratorios, mediante dos series de pruebas de comparación entre los mismos.

Se fortificó una muestra de papaya con los pesticidas malatión y paratión a dos niveles de concentración (0,05 y 0,10mg/kg). Pero, antes de enviar las muestras para el estudio de intercomparación, se evaluó la homogeneidad y exactitud de las mismas aplicando el test t de Student para los 6 resultados del estudio de reproducibilidad, resultando todas aptas.

A su vez, los resultados proporcionados por los laboratorios se analizaron mediante el test z-score. Se obtuvieron excelentes resultados para todos los laboratorios, con valores de z comprendidos entre -1,92 y +0,77 (se admiten valores de $z = \pm 2$). La incertidumbre de las medidas fue inferior al criterio del 25% establecido.

Es un método versátil, rápido, eficiente, respetuoso con el medio ambiente y barato que resulta muy adecuado para el análisis de pesticidas organofosforados en varias muestras de fruta. La validación del método optimizado se realizó según la norma ISO/IEC 17025:2005.

Ese mismo año, Yang et al publicaron por primera vez un método para la determinación de 88 pesticidas en bayas, tales como la frambuesa, la uva, el arándano y la fresa, utilizando la SPE como método de extracción y la GC-MS como técnica de determinación una vez más.

Se evaluaron como disolventes de extracción el acetonitrilo, el acetato de etilo y la acetona, eligiéndose el acetonitrilo por proporcionar extractos más limpios y con menor contenido de materia orgánica que los otros dos disolventes.

La limpieza de los extractos se llevó a cabo mediante el método SPE. La eficiencia de esta etapa depende del tipo y la cantidad de adsorbente, la fuerza eluotrópica o el volumen de eluyente, por lo que se optimizaron esas variables.

También se evaluaron los adsorbentes carbón negro grafitado (Envi-Carb), C₁₈ y NH₂-LC. Ninguno proporcionó buenas recuperaciones de todos los pesticidas ni extractos limpios de materia orgánica. Sin embargo, se comprobó que el acoplamiento de las columnas Envi-Carb y NH₂-LC sí lo conseguía, por lo que se escogió dicha opción. Además, las mejores recuperaciones se obtuvieron con el eluyente acetonitrilo-tolueno (3:1, v/v).

En cuanto a las condiciones experimentales del sistema GC-MS, se optimizaron los programas de temperatura, los caudales y las columnas, para obtener la mejor separación posible de los 88 pesticidas analizados (de los cuales 22 eran organofosforados).

Así, se escogió una temperatura inicial de 70°C en el horno, con rampa de temperatura de 10°C/min, que proporcionó un aumento de la velocidad de análisis sin disminuir la separación de los picos cromatográficos, y un caudal de gas de 1,0mL/min para mejorar la separación cromatográfica y la relación señal/ruido de cada pesticida.

El análisis se realizó en modo de monitoreo de ion seleccionado, basado en la utilización de un ion objetivo (el más abundante) y dos o tres iones secundarios para cada pesticida. Sus abundancias fueron determinadas por inyección de disoluciones patrón individuales de cada pesticida y modo de barrido completo (*full scan*).

Para la validación del método, se evaluó la linealidad (el coeficiente de correlación), la recuperación de pesticidas, y los límites de detección y cuantificación. En la Tabla 32 se muestran los resultados obtenidos para estos parámetros, observándose coeficientes de correlación superiores a 0,990 para todos los pesticidas en el intervalo lineal de 0,025-2,5µg/mL. Para las recuperaciones, se realizaron 5 réplicas de cada medida.

Tabla 32. Recuperación media (%), %RSD, límites de detección (LODs) y límites de cuantificación (LOQs) de los pesticidas organofosforados analizados en frambuesa, fresa, arándano y uva (Yang et al, 2011).

Pesticida	Recuperación, % (RSD, %)												LOD (mg/ kg)	LOQ (mg/ kg)
	Frambuesa			Fresa			Arándano			Uva				
	Conc.fortificada (mg/kg)			Conc.fortificada (mg/kg)			Conc.fortificada (mg/kg)			Conc.fortificada (mg/kg)				
	0,05	0,10	0,50	0,05	0,10	0,50	0,05	0,10	0,50	0,05	0,10	0,50		
Diclorvos	97 (10)	92 (14)	90 (8)	115 (5)	120 (9)	115 (8)	106 (4)	104 (6)	119 (10)	110 (12)	112 (9)	131 (11)	0,01	0,03
Forato	75 (12)	79 (8)	85 (10)	92 (9)	100 (12)	98 (8)	85 (3)	91 (13)	66 (14)	73 (6)	98 (8)	103 (6)	0,01	0,03
Sulfotep	86 (6)	80 (7)	87 (14)	128 (6)	112 (5)	134 (8)	75 (8)	102 (11)	85 (8)	96 (7)	82 (13)	105 (7)	0,01	0,03
Etrimfos	119 (7)	112 (2)	125 (5)	68 (4)	75 (8)	70 (8)	104 (7)	110 (5)	125 (19)	80 (6)	121 (7)	110 (4)	0,01	0,03
Prope- tamfos	120 (6)	123 (4)	126 (6)	128 (6)	129 (9)	136 (10)	115 (4)	110 (15)	104 (6)	110 (11)	105 (17)	113 (5)	0,01	0,03
Diclo- fentión	80 (3)	85 (1)	79 (5)	115 (10)	104 (4)	120 (12)	78 (7)	94 (14)	88 (7)	112 (7)	103 (5)	131 (6)	0,01	0,03
Dimetoato	-	108 (12)	106 (1)	-	123 (13)	124 (11)	-	99 (2)	100 (4)	-	102 (12)	124 (5)	0,03	0,10

Tabla 32 (continuación)

Pesticida	Recuperación, % (RSD, %)												LOD (mg/ kg)	LOQ (mg/ kg)
	Frambuesa			Fresa			Arándano			Uva				
	Conc.fortificada (mg/kg)			Conc.fortificada (mg/kg)			Conc.fortificada (mg/kg)			Conc.fortificada (mg/kg)				
	0,05	0,10	0,50	0,05	0,10	0,50	0,05	0,10	0,50	0,05	0,10	0,50		
Clorpirifós - metilo	80 (3)	88 (7)	82 (5)	100 (2)	108 (17)	110 (8)	97 (11)	104 (7)	115 (12)	101 (8)	110 (9)	121 (8)	0,01	0,03
Fenclorfos	65 (9)	67 (5)	68 (2)	130 (10)	124 (11)	133 (10)	112 (4)	109 (8)	117 (10)	124 (14)	114 (12)	130 (8)	0,01	0,03
Clorpirifós	64 (14)	67 (6)	76 (9)	84 (7)	89 (6)	88 (7)	105 (8)	114 (7)	135 (15)	135 (5)	104 (3)	124 (7)	0,01	0,03
Paratión- metilo	119 (8)	120 (11)	111 (5)	96 (5)	98 (3)	95 (5)	121 (14)	102 (12)	110 (5)	103 (9)	110 (5)	120 (6)	0,00 6	0,02
Pirimifós- etilo	115 (9)	120 (5)	118 (7)	120 (10)	126 (7)	114 (9)	112 (12)	105 (5)	124 (7)	102 (8)	92 (12)	114 (15)	0,00 6	0,02
Fentión	120 (7)	122 (5)	124 (10)	70 (5)	75 (11)	68 (10)	70 (11)	89 (4)	69 (7)	79 (10)	103 (5)	110 (8)	0,01	0,03
Quinalfos	75 (4)	67 (7)	86 (11)	81 (3)	76 (5)	71 (10)	113 (5)	99 (6)	107 (9)	121 (2)	114 (5)	136 ()	0,01	0,03
Clorfenvin- fós	-	110 (7)	118 (8)	-	80 (7)	78 (17)	-	116 (13)	137 (5)	-	105 (11)	112 (7)	0,04	0,10
Protiofos	65 (12)	75 (8)	86 (6)	128 (15)	132 (13)	131 (9)	118 (14)	109 (5)	127 (18)	120 (11)	102 (8)	114 (6)	0,01	0,03
Tribufos	102 (3)	113 (7)	123 (6)	69 (8)	71 (6)	74 (8)	121 (5)	112 (12)	137 (14)	112 (14)	121 ()	103 ()	0,01	0,03
Clortiofos	78 (5)	89 (7)	87 (6)	117 (8)	108 (2)	122 (12)	115 (7)	102 (9)	120 (10)	112 (5)	99 (6)	115 (8)	0,02	0,05
Sulprofos	120 (9)	120 (6)	124 (5)	108 (14)	118 (11)	110 (8)	100 (13)	114 (6)	139 (8)	110 (5)	87 (7)	124 (5)	0,01	0,03
Triazofos	112 (9)	104 (3)	120 (6)	115 (14)	108 (10)	124 (9)	110 (7)	107 (8)	115 (12)	129 (4)	112 (14)	124 (9)	0,02	0,05
EPN	129 (2)	134 (6)	133 (8)	128 (5)	130 (8)	132 (9)	83 (5)	112 (10)	129 (13)	105 (5)	125 (14)	115 (7)	0,01	0,03
Pirazofos	110 (8)	114 (5)	106 (7)	78 (6)	87 (8)	76 (11)	110 (6)	112 (5)	127 (6)	115 (9)	123 (4)	105 (7)	0,02	0,05

En el caso de las frambuesas, las recuperaciones obtenidas son del 64-134%, encontrándose la mayoría de los pesticidas en el intervalo establecido como adecuado del 70-120%. La RSD, que indica la precisión del método evaluada como repetibilidad, fue inferior al 20% establecido por la legislación (no superó el 14%).

Para las muestras de fresa, arándano y uva se obtuvieron valores similares, con recuperaciones del 68-134%, 69-139% y 73-135% y RSDs inferiores al 17%, 19% y 17%, respectivamente. En cuanto al LOD y el LOQ, se obtuvieron valores de 0,006-0,04mg/kg y 0,02-0,1mg/kg, respectivamente.

Por tanto, el método propuesto es válido para el análisis multiresiduo de pesticidas organofosforados en bayas como la frambuesa, uva, arándano y fresa mediante extracción con disolvente orgánico, limpieza del extracto por SPE y análisis por GC-MS.

Cabe destacar que en el momento de la publicación de este artículo, los valores de LOD y LOQ obtenidos se encontraban por debajo de los LMR establecidos para los pesticidas analizados. En la actualidad, varios de ellos se encontrarían por encima de esos valores, lo que refleja que los requerimientos legislativos son cada vez más estrictos para asegurar el correcto uso de los pesticidas y garantizar la seguridad alimentaria de los consumidores.

En el año 2012, K.G. Lee y S.K. Lee desarrollaron un método analítico para la determinación de residuos de pesticidas en yuza y té de yuza mediante GC-NPD, utilizando la extracción en fase sólida (SPE). Se estudian entre otros los pesticidas organofosforados clorpirifós, protiofos y fosalón, por ser de los más utilizados en los cultivos de yuza.

La yuza es una fruta cítrica con propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antivirales y antiinflamatorias procesada comúnmente, sobre todo en Corea, en hierbas medicinales y bebidas debido a su sabor y efectividad contra los resfriados.

Se analizaron 80 muestras de yuza, utilizando cartuchos con 5mL de hexano y 5mL de hexano:acetona (20:80, v/v) para la extracción en fase sólida (SPE) de los pesticidas en las muestras. Se prepararon extractos de muestra por triplicado, transfiriéndose después a cartuchos de Florisil activados.

Tras la carga de la muestra, el cartucho se eluyó con 5mL de hexano:acetona (20:80, v/v), disolvente que se evaporó a sequedad bajo una corriente de nitrógeno.

Finalmente, el residuo seco se redisolvió en 2mL de acetona para su análisis por GC-NPD.

La separación cromatográfica se realizó con una columna capilar de 5-fenil-metilpolisiloxano (DB-5), inyección splitless, volumen de inyección 1 μ L, helio como gas portador con caudal 1,0mL/min, rampa de temperatura en el horno con 120°C iniciales y 280°C de temperatura en el detector NPD.

La preparación de las muestras se validó en términos de linealidad, repetibilidad, límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), y recuperación.

La linealidad se evaluó inyectando la solución mezcla de pesticidas en concentraciones en el intervalo 0,02-10,0 μ g/mL. Se realizó el análisis por triplicado.

El LOD se definió como 3 veces la relación señal/ruido, y el LOQ como 3,3 veces el LOD. Para determinar la recuperación de pesticidas, se fortificaron las muestras con los mismos a concentración 10 μ g/mL. Se realizaron 5 réplicas del análisis.

También se evaluó la repetibilidad (5 réplicas de análisis durante el mismo día) y la reproducibilidad (midiendo una vez al día durante 5 días consecutivos). En la Tabla 33 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 33. Coeficientes de correlación, límites de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ) y recuperaciones de los pesticidas utilizados durante el cultivo de yuza (K.G. Lee y S.K. Lee, 2012).

Pesti- cidas	Linealidad			LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	LMR ($\mu\text{g/g}$)	Recupera- ción (%)	Precisión (%)	
	Rango ($\mu\text{g/mL}$)	Ecuación rectas de calibrado	Coefi- ciente correla- ción (r^2)					Repetibi- lidad ($n = 5$)	Reprodu- cibilidad ($n = 5$)
Clorpirifós	0,02–10	$y = 16,682x + 0,9356$	0,9992	0,02	0,06	0,50	$109,9 \pm 3,9$	10,0	9,4
Protiofos	0,02–10	$y = 18,722x + 2,7729$	0,9972	0,03	0,10	2,00	$99,4 \pm 4,2$	10,3	5,9
Fosalón	0,02–10	$y = 18,116x + 2,9475$	0,9974	0,02	0,06	0,05	$96,0 \pm 3,9$	8,8	11,3

Los coeficientes de correlación obtenidos fueron superiores a 0,9974, mostrando una excelente linealidad entre la concentración de pesticida y las áreas de pico.

Los porcentajes de recuperación se sitúan entre el 96,0% y el 109,9%, con desviaciones estándar relativas inferiores al 4,2%, reflejando la idoneidad del método de extracción para el análisis de rutina de los residuos de pesticidas estudiados.

Los LOD (0,02-0,03 $\mu\text{g/mL}$) y LOQ obtenidos (0,06-0,10 $\mu\text{g/mL}$) se encuentran por debajo de los LMR establecidos para los pesticidas clorpirifós, protiofos y fosalón en yuza.

Por su parte, los estudios de repetibilidad y reproducibilidad proporcionan RSDs por debajo del 10,3% y 11,3%, respectivamente, por lo que cumple con los requerimientos de la UE.

Finalmente, se realizó un análisis de muestras reales de yuza mediante el método validado, no detectándose ninguno de los pesticidas estudiados.

Se concluye que el método resulta perfectamente válido para la determinación de pesticidas organofosforados mediante la técnica GC-NPD en yuza.

En 2014, Tang et al publicaron un método para la determinación simultánea de 10 pesticidas organofosforados en frutas mediante el método de extracción de separación magnética (MSPE) y la cromatografía de gases acoplada al detector fotométrico de llama (GC-FPD).

Se prepararon microesferas magnéticas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{CS}$ (chitosán), biopolímero natural que por su accesibilidad, alta eficacia, y ausencia de productos nocivos, se aplica como un bioadsorbente en la eliminación o recuperación de colorantes, proteínas y metales pesados.

No obstante, también presenta ciertas desventajas tales como sus propiedades mecánicas insatisfactorias, contracción severa y deformación después del secado.

Tras la síntesis primero del compuesto $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y posteriormente de las microesferas magnéticas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{CS}$, se analizó su capacidad de adsorción, y se realizó su caracterización estructural mediante difracción de rayos X, microscopio electrónico de barrido (SEM), análisis termogravimétrico y experimentos de adsorción estática y cinética.

Para el análisis de la capacidad de adsorción, se mezclaron 10g de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y 10mL de la

solución patrón mezcla de los pesticidas estudiados en concentración 100mg/L. Después de sucesivos pasos de tratamiento de la solución, se filtró el extracto y se analizó por GC-FPD. Se obtuvieron valores entre 0,4mg/g y 13,4mg/g, por lo que las microesferas tenían una gran capacidad de adsorción de los 10 pesticidas.

También se evaluó la cinética de adsorción de las microesferas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{CS}$ hacia fosfamidón y clorpirifós a 100mg/L de concentración, obteniéndose valores de 11,1mg/g y 6,8mg/g, lo que supone un 82,8% y 81,0% de la capacidad de adsorción, respectivamente. Por tanto, las microesferas preparadas son idóneas para su uso como adsorbente en el pretratamiento de muestras para extraer y concentrar los 10 residuos de pesticidas en ellas.

El estudio de difracción de rayos X para la caracterización estructural reflejó una interacción efectiva entre $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y CS, análogamente al análisis termogravimétrico realizado. Esto proporciona mayor estabilidad al material magnético compuesto. También se realizó análisis estructural de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{CS}$ por espectroscopía FTIR, obteniéndose espectros FTIR en los que se observaban todos los grupos funcionales del compuesto, por lo que se concluyó que el material funcional con fluido magnético como núcleo y CS como caparazón se había sintetizado con éxito. Finalmente, utilizando SEM se observó que la estructura de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{CS}$ era una partícula redonda irregular de tamaño no homogéneo y la superficie lisa.

Para evaluar la aplicabilidad del material magnético preparado en el método propuesto, previamente se optimizaron condiciones MSPE tales como el nivel de adición de las microesferas magnéticas, el tiempo de extracción, las condiciones de desorción, y el volumen de adición. Con los resultados obtenidos, se mezclaron 50mg de las microesferas magnéticas con 100mL de la solución mezcla de pesticidas y se extrajeron en cartuchos MSPE. Se aisló el material magnético de la suspensión, y los adsorbentes magnéticos resultantes se eluyeron 3 veces con porciones de 1mL de metanol/ácido acético (98:2, v/v) agitando para su completa desorción.

En la Tabla 34 se muestran los resultados obtenidos de coeficiente de correlación en el rango lineal (0,001-10,0mg/L), factores de enriquecimiento y LOD de cada pesticida.

Tabla 34. Coeficientes de correlación, factores de enriquecimiento y LODs de los pesticidas analizados (Tang et al, 2014).

Pesticidas	Rango lineal (mg/L)	R²	Factores de enriquecimiento	LOD (µg/kg)
Triclorfón	0,001-10,0	0,9972	91,4	1,24
Metamidofós	0,001-10,0	0,9998	31,8	1,04
Malatión	0,001-10,0	0,9993	11,9	3,59
Paratión-metilo	0,001-10,0	0,9981	102,8	0,82
Dimetoato	0,001-10,0	0,9998	44,3	2,27
Ometoato	0,001-10,0	0,9986	231,5	2,49
Fosfamidón	0,001-10,0	0,9999	364,7	2,47
Forato	0,001-10,0	0,9999	10,1	2,54
Isocarbofos	0,001-10,0	0,9944	129,5	2,71
Clorpirifós	0,001-10,0	0,9963	180,2	0,31

Se obtuvieron coeficientes de correlación por encima de 0,9944, mostrando gran linealidad en el método. Los factores de enriquecimiento se encuentran entre el 10,1 para el forato y el 364,7 para el fosfamidón, y se determinaron comparando las pendientes de la porción lineal de las curvas de calibrado antes y después de la preconcentración. Por su parte, los LODs (calculados como 3 veces la relación S/N) están en el intervalo 0,31-3,59µg/kg, muy por debajo de los LMRs establecidos para los pesticidas estudiados en manzana y pera.

Se estudió también la precisión del método MSPE-GC y las recuperaciones de los pesticidas, fortificando muestras de pera y manzana con la disolución patrón mezcla de los 10 pesticidas a 2 niveles de concentración, 20µg/kg y 200µg/kg, y analizando cada concentración por triplicado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 35.

Tabla 35. Recuperaciones de los pesticidas organofosforados en muestras de fruta (Tang et al, 2014).

Pesticidas	Conc. fortificada (µg/kg)	Pera			Manzana				
		Conc. en muestra (µg/kg)	Conc. detectada (µg/kg)	Recuperación (%)	RSD (%)	Conc. en muestra (µg/kg)	Conc. detectada (µg/kg)	Recuperación (%)	RSD (%)
Triclorfón	20	2,0	20,6	93,0	4,5	-	18,3	91,7	4,3
	200		178,9	89,5	3,1		186,1	93,1	3,1
Metamidofos	20	-	17,9	89,5	4,9	-	17,7	88,7	5,1
	200		189,5	94,7	3,5		187,8	93,9	4,8
Malatión	20	-	16,4	82,0	4,3	-	16,1	80,6	4,1
	200		171,2	85,6	2,8		172,0	86,0	3,1
Paratión-metilo	20	-	16,9	84,3	5,6	-	16,7	83,3	5,3
	200		190,0	95,0	4,4		191,3	95,6	3,9
Dimetoato	20	-	18,9	94,6	3,1	-	18,5	92,5	2,8
	200		190,2	95,1	2,7		187,1	93,5	2,6
Ometoato	20	3,5	18,7	93,6	4,7	-	19,1	95,7	5,2
	200		185,8	91,2	3,1		186,6	93,3	4,0
Fosfamidón	20	-	18,3	91,6	4,5	9,4	18,0	90,0	4,8
	200		179,3	89,6	3,0		192,9	91,8	3,8
Forato	20	-	16,3	81,4	5,3	-	16,0	79,9	4,9
	200		168,0	84,0	3,8		167,5	83,8	3,3
Isocarbofos	20	-	19,4	96,8	3,9	3,1	19,7	98,7	5,1
	200		191,7	95,9	3,0		191,4	94,1	3,4
Clorpirifós	20	-	18,4	92,0	4,5	-	17,0	85,1	6,3
	200		176,5	88,2	3,6		182,8	91,4	4,8

Como podemos observar, las recuperaciones de los pesticidas obtenidas para las muestras de pera se encuentran entre el 81,4 y el 96,8%, con desviaciones estándar relativas inferiores al 5,6%. En el caso de las manzanas, las recuperaciones oscilan entre el 79,9% y el 88,7%, con RSDs del 2,6-6,3% (cumpliendo el requerimiento de ser inferiores al 20%).

El método desarrollado se aplicó al análisis de muestras de melocotón, detectándose triclorfón, malatión y clorpirifós en concentraciones por debajo de los LMR. El resto de pesticidas estudiados no fueron detectados.

Se concluye que el método es muy preciso y sensible para la determinación de residuos de pesticidas organofosforados en manzanas, melocotones y peras. Además, presenta como

ventajas los menores LOD obtenidos gracias a la adsorción de pesticidas con el compuesto $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{CS}$ y el menor coste de instrumentación y tiempo de análisis que requiere.

En el año 2016, Jaramillo-Colorado et al desarrollaron un método para la determinación de residuos de pesticidas organofosforados en frutas tropicales (mango, guayaba y papaya) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Las muestras de fruta se liofilizaron y, una vez secas, se tamizaron y pulverizaron a un tamaño de partícula de 0,25mm.

Para la extracción de los pesticidas, se usó el método de extracción Soxhlet, utilizando 50mL de mezcla hexano-acetona en proporción 4:1 como disolvente de extracción.

La limpieza de los extractos para eliminar posibles impurezas se realizó a través de una columna pequeña de vidrio con algodón, sulfato de sodio anhidro y Florisil.

El análisis cromatográfico de los extractos de fruta se realizó en un cromatógrafo de gases con puerto de inyección split/splitless y un detector FID. Se utilizaron columnas capilares para la separación de analitos, de fase estacionaria 5% difenil-95% polidimetilsiloxano.

Se obtuvo una buena linealidad del método en el intervalo de concentración 1,0-10 $\mu\text{g/mL}$, con coeficientes de correlación superiores a 0,9925 para todos los compuestos.

Para el análisis de las recuperaciones de los pesticidas, se fortificaron las muestras de mango, guayaba y papaya con la disolución mezcla de pesticidas a tres niveles de concentración (2,0, 7,3 y 10mg/kg). La Tabla 36 recoge los resultados obtenidos.

Tabla 36. Recuperaciones y LMRs de los pesticidas estudiados (Jaramillo-Colorado et al, 2016).

Pesticidas	Conc. fortificada (mg/kg)	Recuperación (%)	LMR (ppm)
Disulfotón	2,0	100,0 \pm 1,3	0,01
	7,3	109,0 \pm 1,6	
	10,0	104,0 \pm 0,0	
Clorpirifós	2,0	100,0 \pm 1,3	0,05
	7,3	109,0 \pm 1,6	
	10,0	104,0 \pm 0,0	
Azinfós-metilo	2,0	100,0 \pm 1,3	0,05
	7,3	109,0 \pm 1,6	
	10,0	104,0 \pm 0,0	

Las recuperaciones obtenidas (90,0-109,0%) se encuentran entre el intervalo sugerido por la regulación de la Comisión Europea (70-120%). Además, los resultados de RSD están por debajo del límite permitido para residuos de pesticidas de acuerdo con SANCO. La Tabla 37 muestra los resultados obtenidos del análisis de muestras reales de las frutas estudiadas.

Tabla 37. Cuantificación de pesticidas organofosforados en muestras de fruta (Jaramillo-Colorado et al, 2016).

Fruta	Disulfotón (ppm)	Clorpirifós (ppm)	Azinfós-metilo (ppm)
Mango	4,19 \pm 1,16	10,35 \pm 1,32	1,60 \pm 1,23
Mango	5,88 \pm 0,44	ND	12,10 \pm 3,96
Papaya	ND	ND	0,61 \pm 0,01
Papaya	2,47 \pm 0,38	ND	1,95 \pm 0,80

Tabla 37 (continuación)

Fruta	Disulfotón (ppm)	Clorpirifós (ppm)	Azinfós-metilo (ppm)
Guayaba	2,00±0,73	ND	ND
Guayaba	0,82±0,40	ND	ND

Se observa que las dos muestras de guayaba analizadas presentaron concentración de disulfotón mayor al LMR establecido, no detectándose el resto de pesticidas estudiados.

En cuanto a las muestras de papaya, una de ellas presentó concentración de disulfotón superior al LMR establecido de 0,01ppm y las dos contenían azinfós-metilo en concentración superior al LMR (0,05ppm), no detectándose clorpirifós en ninguna de ellas.

Por su parte, las muestras de mango presentaron concentración de los pesticidas superior a los LMR establecidos, excepto una muestra de mango en la que no se detectó clorpirifós.

Estos resultados son alarmantes, ya que se detectan frutas en mercados y supermercados locales que no cumplen con los requerimientos legislativos establecidos, lo que supone un riesgo para la salud de los consumidores. Se concluye que, en función de los valores de los parámetros analíticos obtenidos, el método es adecuado para el fin propuesto.

Silipunyo et al publicaron en el año 2017 un método para la determinación de residuos de pesticidas organofosforados en naranja, manzana, pera, fruta del dragón, fresa, guayaba y uva verde y roja mediante GC-FPD.

La extracción de las muestras se realizó siguiendo una modificación del método publicado por Fillion et al en el año 2000, y el análisis cromatográfico se llevó a cabo con un cromatógrafo de gases equipado con columna capilar DB-5MS, con acoplamiento a un detector de nitrógeno-fósforo. La Figura 10 muestra el cromatograma obtenido del análisis de los pesticidas organofosforados por GC-FPD.

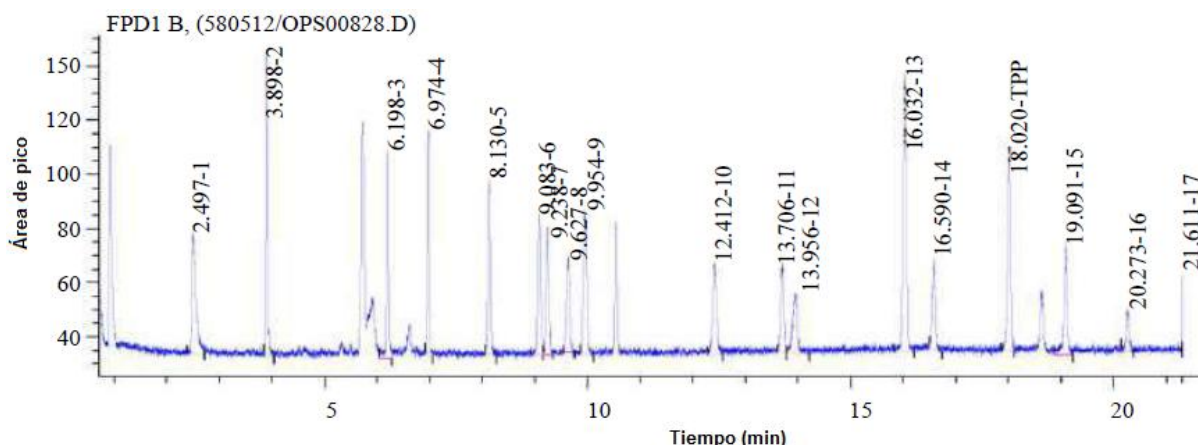


Figura 10. Cromatograma de los pesticidas organofosforados por GC-FPD a concentración 100µg/mL.

Picos: 1. Metamidofós, 2. Mevinfós, 3. Dimetoato, 4. Diazinón, 5. Paratión-metilo, 6. Pirimifos-metilo, 7. Fenitrotión, 8. Malatión, 9. Clorpirifós, 10. Metidatión, 11. Protiofos, 12. Profenofos, 13. Etión, 14. Triazofos, 15. EPN, 16. Azinfós-metilo, 17. Azinfós-etilo (Silipunyo et al, 2017).

Se determinaron varios parámetros de control de calidad del método, tales como el coeficiente de correlación en el rango lineal, el LOD, el LOQ, las recuperaciones obtenidas para los analitos en los 3 niveles de concentración en los que se fortificaron las muestras y las desviaciones estándar relativas obtenidas de dichas medidas. La Tabla 38 recoge los resultados obtenidos, así como el tiempo de retención que presentó cada pesticida.

Tabla 38. Parámetros de control de calidad de los pesticidas organofosforados analizados por GC-PPD (Silipunyo et al, 2017).

Pesticida	Tiempo de retención (min)	R ²	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	Recuperación (%)			% RSD (n=3)			% RSD (n=5)
					Bajo	Medio	Alto	Bajo	Medio	Alto	
Metamidofós	2,519	0,996	0,003	0,005	92,43 (±2,45)	89,88 (±6,84)	99,74 (±1,30)	10,62	7,61	0,33	6,79
Mevinfós	3,910	0,997	0,002	0,005	83,63 (±4,71)	97,40 (±7,05)	104,68 (±10,23)	18,14	6,88	2,41	8,55
Dimetoato	6,224	0,997	0,002	0,005	86,93 (±1,19)	85,70 (±0,69)	99,41 (±9,06)	5,46	0,80	2,28	1,74
Diazinón	6,991	0,998	0,002	0,005	99,73 (±0,37)	96,89 (±4,58)	98,03 (±13,44)	1,47	4,72	3,43	6,71
Paratión-metilo	8,159	0,999	0,002	0,005	94,00 (±2,00)	95,19 (±5,12)	99,83 (±5,64)	8,52	5,38	1,41	5,58
Pirimifós-metilo	9,100	1,000	0,002	0,005	99,15 (±1,47)	92,08 (±1,45)	99,02 (±8,95)	5,93	1,58	2,26	4,95
Fenitrotión	9,256	0,999	0,002	0,005	95,96 (±1,64)	93,25 (±3,68)	97,94 (±8,34)	6,84	3,94	2,13	3,33
Malatión	9,608	0,998	0,002	0,005	94,55 (±0,90)	98,15 (±2,43)	98,90 (±2,64)	3,81	2,47	0,67	3,80
Clorpirifós	9,978	0,996	0,002	0,005	114,61 (±11,05)	111,18 (±11,50)	114,32 (±62,99)	17,44	7,88	12,80	6,67
Metidatión	12,439	0,998	0,002	0,005	94,47 (±1,11)	87,85 (±6,23)	98,77 (±14,09)	4,70	7,10	3,57	5,43
Protiofos	13,720	0,999	0,002	0,005	94,04 (±0,72)	94,74 (±0,75)	96,72 (±3,11)	3,06	0,79	0,80	5,87
Profenofos	13,980	0,999	0,002	0,005	93,04 (±1,66)	87,07 (±2,13)	97,54 (±16,05)	7,14	2,45	4,11	2,47
Etión	16,058	0,998	0,002	0,004	117,70 (±1,22)	92,95 (±2,76)	98,36 (±0,20)	5,19	2,97	0,05	4,88
Triazofos	16,628	0,999	0,002	0,005	95,85 (±1,03)	88,73 (±4,79)	98,37 (±1,58)	4,29	5,40	0,40	3,83
EPN	19,109	0,998	0,002	0,005	97,93 (±0,94)	98,28 (±1,63)	98,37 (±3,81)	3,85	1,66	0,97	5,50
Azinfós-metilo	20,337	0,996	0,003	0,005	89,95 (±1,04)	91,95 (±2,80)	94,27 (±21,52)	4,62	3,04	5,71	6,67
Azinfós-etilo	21,631	0,999	0,002	0,005	93,64 (±1,07)	97,79 (±3,26)	95,94 (±6,85)	4,55	3,33	1,79	6,50

Los coeficientes de correlación de las curvas del calibrado fueron superiores a 0,9961 en todos los casos. Por su parte, el límite de detección y cuantificación osciló entre 0,002-0,003mg/kg y 0,004-0,005mg/kg, respectivamente, siendo por tanto bastante inferiores a los LMR establecidos por la legislación para los pesticidas en las muestras de fruta analizadas.

En cuanto a las recuperaciones, se encuentran entre el 83,63% y el 117,70%; cumpliendo por tanto el requerimiento legislativo de situarse entre el 70% y el 120%.

Después, se aplicó el método en 124 muestras reales obtenidas de varios supermercados, entre las que había naranjas, manzanas, peras, pitahayas, fresas, guayabas y uvas.

En la Tabla 39 se muestran los pesticidas identificados y su concentración en las muestras, así como los LMR establecidos por la legislación vigente. Se observa que el clorpirifós fue el pesticida con mayor presencia en todo tipo de muestras, encontrándose en un 78,57% de las naranjas, un 9,09% de las manzanas, un 10% de las fresas, un 36,66% de las guayabas, un 8,33% de las uvas verdes y un 8,33% de las uvas rojas. No obstante, en ningún caso supera el LMR establecido.

Después de él, los más abundantes en las frutas fueron el metidatió y el etió, cuantificándose también dimetoato, diazinón, malatió, protiofos, profenofos, triazofos, y fenitrotiό en algunas de las muestras.

Además, las concentraciones más altas de pesticidas determinadas corresponden al etiό en pera (0,877mg/kg), y profenofos, etiό, malatiό y triazofos en naranja.

Tabla 39. Pesticidas organofosforados en frutas de mercados y supermercados (Silipunyo et al, 2017).

Fruta	Número de muestras detectadas	Nombre del pesticida detectado	Número de muestras con pesticidas	Concentración del pesticida detectado (mg/kg)	LMR (mg/kg)
Muestras de fruta (n = 124)					
Naranja	14	Dimetoato	1 (7,14)	0,042	0,01
		Diazinón	3 (21,43)	0,027±0,020	0,01
		Malatió	5 (35,71)	0,221±0,137	2,00
		Clorpirifós	11 (78,57)	0,082±0,128	0,30
		Protiofos	1 (7,14)	0,002	-
		Profenofos	2 (14,29)	0,531±0,097	0,01
		Etió	11 (78,57)	0,294±0,295	0,01
		Triazofos	11 (78,57)	0,118±0,104	0,01
		Diazinón	3 (27,27)	0,001±0,000	0,01
Manzana	11	Clorpirifós	1 (9,09)	0,003	0,01
		Etió	1 (9,09)	0,001	0,01
		Diazinón	1 (10)	0,001	0,01
Pera	10	Malatió	1 (10)	0,059	0,02
		Metidatió	4 (40)	0,027±0,024	0,03
		Etió	1 (10)	0,877	0,01
		Metidatió	2 (20)	0,004±0,003	0,02
Fruta del dragón	11	Clorpirifós	1 (10)	0,030	0,50
Guayava	30	Malatió	2 (6,66)	0,002±0,002	0,02
		Clorpirifós	11 (36,66)	0,017±0,015	0,05
		Metidatió	11 (36,66)	0,009±0,004	0,02
		Protiofos	1 (3,33)	0,004	-
		Profenofos	1 (3,33)	0,006	0,01
		Etió	6 (20)	0,015±0,009	0,01
		Triazofos	1 (3,33)	0,002	0,01
Uva verde	12	Clorpirifós	1 (8,33)	0,002	0,30
Uva roja	24	Fenitrotiό	1 (4,16)	0,002	0,01
		Clorpirifós	2 (8,33)	0,015±0,012	0,30
		Metidatió	1 (4,16)	0,088	0,02

En función de los resultados obtenidos, el método resulta válido para el objetivo propuesto.

Un total de 11 concentraciones de pesticidas en muestras de frutas fueron superiores a los LMR establecidos por la legislación europea, lo que resulta realmente preocupante. No obstante, este trabajo de investigación se realizó en Tailandia, país en el que las concentraciones de pesticidas en frutas permitidas son bastante superiores a las europeas.

Particularmente interesante resulta el estudio que hicieron para evaluar posibles riesgos para la salud humana por la exposición a pesticidas organofosforados debido al consumo de frutas. Se realizaron cuestionarios para estimar la ingesta de dichos pesticidas a participantes seleccionados que consumieron frutas, y se calculó su consumo diario.

No se encontró riesgo de toxicidad por pesticidas entre los voluntarios analizados, aunque a largo plazo los consumidores masculinos tenían riesgo de cierta toxicidad.

Ya en el presente año, Freitas et al desarrollaron un método para la determinación de residuos de pesticidas, en su mayoría organofosforados, en frutas tropicales (plátano, mango, melón, papaya y piña) utilizando la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) y la cromatografía de gases de alta resolución como técnica analítica de determinación.

Para los estudios de recuperación y la preparación de las disoluciones del calibrado, se utilizaron muestras de fruta sin tratar con pesticidas, para lo que previamente se comprobó la ausencia de dichos compuestos mediante análisis por GC-MS de los extractos.

Se prepararon 8 disoluciones de calibrado en el intervalo de concentraciones 0,05-2,5µg/g, escogido en función de los LMR existentes para los pesticidas y las frutas analizadas.

Para la extracción de los pesticidas se utilizaron cartuchos de polipropileno con la matriz dispersada, unido a otro conteniendo 0,5g de adsorbente de limpieza, consiguiendo la extracción de los pesticidas y la limpieza de los extractos obtenidos en un único proceso.

Una vez optimizadas las condiciones experimentales, se utilizó como material de fase sólida para la dispersión C₁₈ y gel de sílice, Florisil y alúmina como adsorbentes para limpiar los extractos. Como eluyente para la columna MSPD, se evaluaron varios disolventes orgánicos y mezclas de ellos, escogiéndose acetato de etilo por proporcionar mejores recuperaciones. La Tabla 40 muestra los resultados obtenidos para los parámetros de validación estudiados (selectividad, exactitud, precisión, LOD, LOQ y coeficiente de correlación en el rango lineal).

Tabla 40. Rango lineal, coeficiente de correlación (r^2), límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), recuperación y límites máximos de residuos para todos los pesticidas investigados (Freitas et al, 2018).

Pesticida	Rango lineal (µg/g)	Coeficiente de correlación (r^2)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Recuperación (%)	LMR (mg/kg)
Papaya						
Diazinón	0,05-2,50	0,997	5	50	93	0,01
Dimetoato	0,05-2,50	0,996	15	50	86	0,01
Fenitrotión	0,05-2,00	0,989	20	50	77	0,01
Paratión metil	0,05-2,00	0,995	5	50	744	0,01

Tabla 40 (continuación)

Pesticida	Rango lineal (µg/g)	Coefficiente de correlación (r ²)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Recuperación (%)	LMR (mg/kg)
Melón						
Diazinón	0,05-2,50	0,991	6	50	93	0,01
Dimetoato	0,05-2,50	0,994	15	50	110	0,01
Fenitrotión	0,05-2,00	0,990	25	50	75	0,01
Paratión metil	0,05-2,00	0,997	5	50	1084	0,01
Plátano						
Diazinón	0,05-2,50	0,990	5	50	102	0,01
Dimetoato	0,05-2,50	0,991	15	50	90	0,01
Fenitrotión	0,05-2,00	0,997	20	50	105	0,01
Paratión metil	0,05-2,00	0,992	5	50	105	0,01
Mango						
Diazinón	0,05-2,50	0,994	10	50	719	0,01
Dimetoato	0,05-2,50	0,991	15	50	71	0,01
Fenitrotión	0,05-2,00	0,999	20	50	80	0,01
Paratión metil	0,05-2,00	0,991	5	50	71	0,01
Piña						
Diazinón	0,05-2,50	0,990	10	50	88	0,3
Dimetoato	0,05-2,50	0,990	15	50	89	0,01
Fenitrotión	0,05-2,00	0,993	20	50	78	0,01
Paratión metil	0,05-2,00	0,992	5	50	90	0,01

Se observa que los coeficientes de correlación de los pesticidas son mayores de 0,989. Además, el LOD y el LOQ son inferiores a los LMR establecidos en Brasil (0,001mg/kg).

No obstante, cabe destacar que no ocurre en el caso de la legislación europea, más estricta y para la cual los límites de detección del dimetoato y el fenitrotión se encontrarían por encima de los LMR establecidos para ellos en las frutas analizadas (0,01mg/g).

Se obtienen buenas recuperaciones, del 71-110%, excepto para el paratión-metilo en muestras de papaya y melón, y para el diazinón en mango, obteniéndose valores anormalmente altos (por encima del 719%).

Se evaluó también la exactitud, la repetibilidad y la reproducibilidad del método, mediante el estudio de la recuperación de pesticidas en muestras fortificadas a tres niveles de concentración (0,05, 0,50 y 1,0µg/g). La repetibilidad y la reproducibilidad se expresan como %RSD de las recuperaciones obtenidas en el mismo día y en diferentes días, respectivamente. La Tabla 41 muestra los resultados obtenidos de estos parámetros.

Tabla 41. Recuperaciones medias (Rm) y sus desviaciones estándar relativas (RSD) obtenidas en el mismo día (repetibilidad) y en días consecutivos (reproducibilidad) de los pesticidas objeto de estudio (Freitas et al, 2018).

Pesticida	Repetibilidad (mismo día)						Reproducibilidad (días consecutivos)					
	0,05µg/g		0,50µg/g		1,00µg/g		0,05µg/g		0,50µg/g		1,00µg/g	
	Rm (%)	RSD (%)	Rm (%)	RSD (%)	Rm (%)	RSD (%)	Rm (%)	RSD (%)	Rm (%)	RSD (%)	Rm (%)	RSD (%)
Dimetoato	76	19,8	86	14,1	89	10,4	85	12,6	80	9,7	98	12,6
Diazinón	105	2,8	88	3,6	86	8,3	85	6,7	91	13,3	95	7,7
Paratión-metilo	90	19,8	97	10,3	93	8,3	90	15,5	97	14,9	94	13,9
Fenitrotión	80	17,3	96	4,2	81	7,7	79	17,5	98	14,7	94	6,5

Se obtiene repetibilidad del 2,8-19,8%, reproducibilidad del 6,5-17,5% y recuperaciones medias del 76-105% y 79-98%, respectivamente. El método, por tanto, cumple con todos los criterios establecidos para cada uno de los parámetros evaluados.

La Figura 11 muestra los cromatogramas obtenidos del análisis mediante GC-ECD después de la extracción por MSPD de los pesticidas organofosforados diazinón, fenitrotión, dimetoato y paratión metil en las diferentes frutas analizadas, fortificadas en este caso al nivel de concentración de 0,50µg/mL.

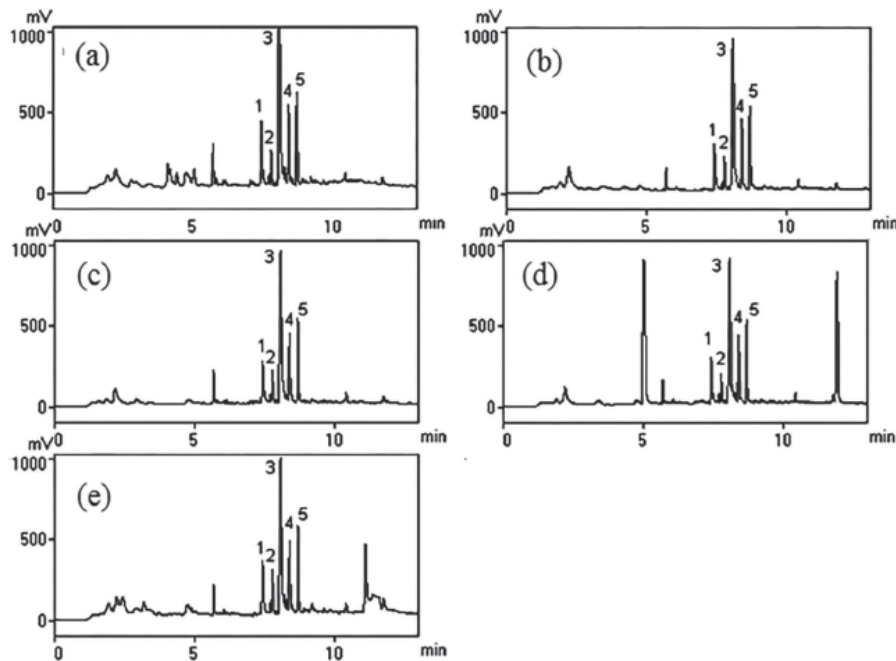


Figura 11. Cromatogramas obtenidos por GC-ECD de extractos de (a) plátano, (b) mango, (c) melón, (d) papaya, (e) piña, fortificadas con pesticidas a 0,50µg/mL de concentración. Picos: 1. Dimetoato, 2. Diazinón, 4. Paratión-metilo, 5. Fenitrotión. El pico 3 corresponde al pesticida organoclorado clorotalonil (Freitas et al, 2018).

En función de los resultados obtenidos, el método analítico proporciona selectividad, linealidad, precisión, y exactitud, por lo que es perfectamente válido para el análisis de pesticidas organofosforados en muestras tropicales como las analizadas.

En la actualidad, se están desarrollando nuevas técnicas y modificaciones de las ya existentes con el objetivo de obtener límites de detección más bajos que permitan realizar análisis traza de pesticidas en frutas y cumplir con los cada vez más exigentes límites máximos de residuos de pesticidas permitidos por la legislación europea.

Así, por ejemplo, Yang et al publicaron hace escasos meses un método para la determinación de pesticidas, entre los que se encontraban los organofosforados fenclorfos, bromofós-metilo, tribufos y pirazofos, que permitió su análisis traza en una fruta cítrica originaria de Japón denominada kabosu.

La técnica consiste en el clásico acoplamiento de la cromatografía de gases y la espectrometría de masas, pero utilizando como fuente de ionización un láser de femtosegundos emitiendo a 267nm, 400nm y 800nm (longitudes de onda optimizadas para los pesticidas analizados), y con ella se obtuvieron límites de detección del orden de subfentogramos (pg/μL), lo que aporta una elevadísima sensibilidad a la técnica.

6. TABLA RESUMEN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS COMENTADOS.

En la siguiente Tabla se resumen los estudios recogidos en este trabajo de investigación.

Tabla resumen de los estudios realizados para la determinación de residuos de pesticidas organofosforados en frutas.

Matriz	Analito	Método de extracción	Sistema de detección	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	Recuperación (%)	Referencia bibliográfica
Pera	34 pesticidas organofosforados	QuEChERS modificado	GC/MS/MS, GC/NPD, GC/XSD			77,1-110,7%	Schenck et al, 2008
Kiwi	Clorpirifós-metilo, EPN	ASE, SFE, LLE	GC-MS	0,003-0,005	0,008-0,015	71,9-110,9%	Cho et al, 2008
Coco	Triclorfón, dimetoato, malatión	MSPD	GC-MS	0,15-0,17	0,25	70,2-98,7%	Dantas Silva et al, 2008
Manzana	13 pesticidas organofosforados	QuEChERS	GC-MS rápida,	0,24-3,70	0,80-12,32		Hůšková et al, 2008
Naranja	Malatión	QuEChERS	GC-NCI-MS, GC-EI-MS	$(0,008-5,505) \cdot 10^{-5}$	$(0,027-18,350) \cdot 10^{-5}$	70-110%	Hůšková et al, 2009
Uva	14 pesticidas organofosforados	QuEChERS	GC-MS, LP-GC/MS	0,001-0,012		58-120%	Cunha et al, 2009
Plátano de Canarias	10 pesticidas organofosforados	QuEChERS	GC-NPD	0,019-0,082	0,01-0,09	67-118%	Hernández-Borges et al, 2009
Naranja, pera, uva, manzana	15 pesticidas organofosforados	MSPD	GCxGC-μECD, GC-qMS	$(0,005-250) \cdot 10^{-3}$		46-121%	Ramos et al, 2009
Mango	4 pesticidas organofosforados	DI-SPME, HS-SPME	GC-MS	0,001-0,005	0,003-0,017	52,25-117,52%	Menezes Filho et al, 2010
Mandarina	Clorpirifós-etilo	DPX, Luke modificado, Micro-Luke	GC-NPD	0,077	0,233	91,5±93,9%	Guan et al, 2010
Naranja	17 pesticidas organofosforados	DPX-RP	GC-MS	0,0005-0,0139	0,0011-0,0278	76,0-101,7% Mevinfós:20,7% Diclorvos:41,0%	Guan et al, 2010

Tabla resumen de los estudios realizados para la determinación de residuos de pesticidas organofosforados en frutas (continuación).

Matriz	Analito	Método de extracción	Sistema de detección	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	Recuperación (%)	Referencia bibliográfica
Uva, mango, granada	11 pesticidas organofosforados	Extrac. con disolvente orgánico + limpieza por d-SPE	GC-MS/MS		0,004-0,009	70-109%	Savant et al, 2010
10 frutas	25 pesticidas organofosforados	MAE + d-SPE	GC-MS	0,004-0,060	0,025	77-114%	Satpathy et al, 2011
Uva, fresa, frambuesa, arándano	22 pesticidas organofosforados	SPE	GC-MS	0,006-0,040	0,02-0,10	64-139%	Yang et al, 2011
Yuza	Clorpirifós, protiofos, fosalón	SPE	GC-NPD	0,02-0,03	0,06-010	96,0-109,9%	K.G.Lee et al, 2012
Pera, manzana	10 pesticidas organofosforados	MSPE	GC-FPD	0,0003-0,0036		81,4-96,8%	Tang et al, 2014
Mango, guayaba, papaya	Disulfotón, Clorpirifós, Azinfós-metilo	Extracción Soxhlet	GC-FID, GC-MS			100,0-109,0%	Jaramillo-Colorado et al, 2016
8 frutas	17 pesticidas organofosforados	Método Fillion modificado	GC-FPD	0,002-0,003	0,004-0,005	83,63-117,70%	Silipunyo et al, 2017
5 frutas tropicales	Diazinón, dimetoato, fenitrotión, paratión-metilo	MSPD	HRGC-ECD, GC-MS	0,005-0,025	0,05	71-110%	Freitas et al, 2018
Kabosu	Fenclorfos, bromofós-metilo, tribufos, pirazofos		GC-MS		del orden de subfentogramos (pg/μL)		Yang et al, 2018

7. CONCLUSIONES.

- Los pesticidas son compuestos necesarios en la agricultura, pero resultan tóxicos si no se utilizan dentro de ciertos márgenes, de ahí que sea tan importante su determinación. La exigente legislación europea existente respecto a su uso, unida a la complejidad de las matrices en las que se encuentran los pesticidas (frutas y vegetales, principalmente), hace necesaria la utilización de técnicas analíticas de alta sensibilidad y fiabilidad.
- En la última década, se han desarrollado muchos procedimientos para la determinación de pesticidas organofosforados, por ser de los más utilizados en la actualidad, en frutas, por lo que en este trabajo se han resumido las metodologías más eficaces y novedosas para dicha determinación en frutas de todo tipo y origen. Dicho origen es precisamente el que ha hecho que algunos de los métodos de determinación recogidos sean útiles en sus países de procedencia pero no cumplan los requerimientos de la legislación europea (como en la publicación de Silipunyo et al, 2017), que ha mostrado ser más exigente.
- La cromatografía de gases, y concretamente su acoplamiento a la espectrometría de masas, es la técnica analítica por excelencia, apareciendo en el 65% de los trabajos publicados debido a la alta selectividad y sensibilidad que posee, con límites de detección y cuantificación de hasta ppb o incluso ppt (como en el trabajo de Húšková et al, 2009), y el menor tiempo de análisis gracias a la identificación y cuantificación en una única etapa. También proporciona buenos resultados el detector selectivo NPD, presente en alrededor del 20% de los trabajos, con límites de detección y cuantificación del orden de ppm.
- En lo que respecta a las técnicas de extracción, necesarias debido a la complejidad de los analitos y las matrices en las que determinarlos, se observa una tendencia cada vez mayor hacia la miniaturización, automatización y menor empleo de disolventes y tiempo de análisis. En los trabajos de investigación publicados evaluados, se observa el uso satisfactorio de todo tipo de métodos de extracción de pesticidas (ASE, SFE, LLE, MSPD, SPME, Soxhlet, MAE, SPE, etc.), pero el preferido por los autores es el método QuEChERS, que cumple con las características deseadas para un método de extracción actual, y presenta generalmente muy buenas recuperaciones en el caso de los pesticidas organofosforados en muestras de fruta, superiores al 70% en la mayoría de matrices.
- Actualmente, se investiga la utilización de nuevos adsorbentes que proporcionen ventajas analíticas y medioambientales, como el carbón negro grafitado, PSA, o $MgSO_4$.
- Se espera que en el futuro la legislación sea cada vez más restrictiva en el uso de estos compuestos, lo que hace necesario desarrollar nuevos métodos más sensibles y fiables en la determinación de pesticidas organofosforados en frutas. Como ejemplo, hace pocos meses Yang et al desarrollaron uno capaz de proporcionar límites de detección de $pg/\mu L$.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Akram, S., Mushtaq, M. *Techniques to detect and detoxify organophosphorus pesticides from fruit juices*. Fr. J., Ext. Comp. Qual. Anal. (2018) 363-389.
- Albero, M.B. *Determinación de residuos de contaminantes orgánicos en miel y zumos*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Dep. de Química Analítica, 2009.
- Altieri, M.A., Nicholls, C.I. *Modelos ecológicos y resilientes de producción agrícola para el siglo XXI*. Agroecología, 6 (2012) 28-37.
- Anastassiades, M., Lehota, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F.J. *Fast and easy multi-residue method employing acetonitrile extraction/partitioning & "Dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce*. J. AOAC Int., 86, 2 (2003) 412-431.
- Chandra, S., Mahindrakar, A.N., Shinde, L.P. *Gas chromatography-mass spectrometry determination of pesticide residue in fruits*. Int. J. of ChemTech Res., 6, 1 (2014) 124-130.
- Cho, S-K., Abd El-Aty, A.M., Jeon, H-R., Choi, J-H., Shin, H-C., Shim, J-H. *Comparison of different extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues in kiwi fruit using gas chromatography-mass spectrometry*. Biom. Chr., 22 (2008) 727-735.
- Codex Alimentarius. Normas Internacionales de los Alimentos (FAO, OMS). <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/es/> (acceso Junio 2018).
- Cunha, S.C., Fernandes, J.O., Alves, A., Oliveira, M.B.P.P. *Fast low-pressure gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of multiple pesticides in grapes, musts and wines*. Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 119-126.
- Dantas Silva, M.G., Aquino, A., Silveira Dórea, H., Navickiene, S. *Simultaneous determination of eight pesticide residues in coconut using MSPD and GC/MS*. Tal., 76 (2008) 680-684.
- Dömötöróvá, M., Matisová, E. *Fast gas chromatography for pesticide residues analysis*. J. Chrom. A, 1207 (2008) 1-16.
- Fernandes, V.C., Domingues, V.F., Mateus, N., Delerue-Matos, C. *Determination of pesticides in fruit and fruit juices by chromatographic methods. An overview*. J. Chr. Sc., 49 (2011).
- Fillion, J., Sauvé, F., Selwyn, J. *Multiresidue method for the determination of residues of 251 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection*. J. AOAC Int., 83, 3 (2000) 698-713.
- Freitas, S.S., Sarafim, F.A.T., Lanças, F.M. *Determination of target pesticide residues in tropical fruits employing matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction followed by high resolution gas chromatography*. J. Braz. Chem. Soc., 29, 5 (2018) 1140-1148.

- Gilbert López, B. Nuevas metodologías analíticas basadas en espectrometrías de masas para el análisis multi-residuo de plaguicidas y otros contaminantes en vegetales con alto contenido graso y en productos alimenticios de origen vegetal. Universidad de Jaén, Facultad de Ciencias Experimentales, Departamento de Química Física y Analítica, 2010.
- Guan H., Brewer W.E., Garris S.T., Craft C., Morgan S.L. *Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables using disposable pipette extraction (DPX) and Micro-Luke Method*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58 (2010) 5973-5981.
- Guan H., Brewer W.E., Garris S.T., Morgan S.L. *Disposable pipette extraction for the analysis of pesticides in fruit and vegetables using gas chromatography/mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 1867-1874.
- Guillet, V., Fave, C., Montury, M. *Microwave/SPME method to quantify pesticide residues in tomato fruits*. Journal of Environmental Science and Health Part B, 44 (2009) 415-422.
- Gutiérrez, J.A., Pinzón, M.I., Londoño, A., Blach, D., Rojas, A.M. *Residuos de plaguicidas organoclorados, organofosforados y análisis fisicoquímico en piña (Ananas comosus L.)*. Agro Sur, 38 (2010) 199-211.
- Hernández-Borges, J., Cabrera Cabrera, J., Rodríguez-Delgado, M.A., Hernández-Suárez, E.M., Galán Saúco, V. *Analysis of pesticide residues in bananas harvested in the Canary Islands (Spain)*. Food Chemistry, 113 (2009) 313-319.
- Húšková, R., Matisová, E., Kirchner, M. *Fast GC-MS pesticide multiresidue analysis of apples*. Chromatographia, 68, 1 (2008) 49-55.
- Húšková, R., Matisová, E., Hrouzková, S., Svorc, L. *Analysis of pesticide residues by fast gas chromatography in combination with negative chemical ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 6326-6334.
- Jaramillo-Colorado, B.E., Palacio-Herrera, F., Pérez-Sierra, I. *Residuos de pesticidas organofosforados en frutas obtenidas de plazas de mercado y supermercados en Cartagena, Colombia*. Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias, 25, 4 (2016) 39-46.
- Kmellár, B., Fodor, P., Pareja, L., Ferrer, C., Martínez-Uroz, M.A., Valverde, A., Fernández-Alba, A.R. *Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid-chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1215 (2008) 37-50.
- Lee, K-G., Lee, S-K. *Monitoring and risk assessment of pesticide residues in yuza fruits (Citrus junos Sieb. ex Tanaka) and yuza tea samples produced in Korea*. Food Chem., 135 (2012) 2930-2933.

- Límites máximos de residuos de pesticidas en alimentos en la Unión Europea (Comisión Europea, 2018). <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN> (Acceso Junio 2018).
- Menezes Filho, A., Neves dos Santos, F., de Paula Pereira, P.A. *Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC-MS) for the determination of pesticide residues in mangoes*. *Talanta*, 81 (2010) 346-354.
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Informe Anual de Indicadores 2016. https://www.mapama.gob.es/es/ministerio/servicios/analisis-y-prospectiva/aypinformeannualindicadores_2016_junio_tcm30-381441.pdf (acceso Junio 2018).
- Pérez, M.A., Segura, A., García, R., Colinas, T., Pérez, M., Vázquez, A., Navarro, H. *Residuos de plaguicidas organofosforados en cabezuela de brócoli (Brassica oleracea) determinados por cromatografía de gases*. *Rev. Int. Cont. Ambient.*, 25,2 (2009) 103-110.
- Pérez, M.A., Navarro, H., Miranda, E. *Residuos de plaguicidas en hortalizas: problemática y riesgo en México*. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 29 (2013) 45-64.
- Picó, Y., Fernández, M., Ruiz, M.J., Font, G. *Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment*. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70 (2007) 117-131.
- Plenge-Tellechea, F., Sierra-Fonseca, J.A., Castillo-Sosa, Y.A. *Riesgos a la salud humana causados por plaguicidas*. *Tecnociencia Chi.*, 1, 3 (2007).
- Ramos, J.J., González, M.J., Ramos, L. *Comparison of gas chromatography-based approaches after fast miniaturised sample preparation for the monitoring of selected pesticide classes in fruits*. *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 7307-7313.
- Reglamento (CE) 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo.
- Reglamento (UE) 2018/687 de la Comisión, de 4 de mayo de 2018, que modifica los anexos II y III del Reglamento (CE) n.º 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo.
- Reglamento de Ejecución (UE) 2018/555 de la Comisión de 9 de abril de 2018 relativo a un programa plurianual coordinado de control de la Unión para 2019, 2020 y 2021 destinado a garantizar el respeto de los LMR de plaguicidas en los alimentos de origen vegetal y animal y a evaluar el grado de exposición de los consumidores a estos residuos.

- Satpathy, G., Kumar Tyagi, Y., Kumar Gupta, R. *A novel optimised and validated method for the analysis of multi-residues of pesticides in fruits and vegetables by microwave-assisted extraction (MAE)-dispersive solid-phase extraction (d-SPE)-retention time locked (RTL)-gas chromatography-mass spectrometry with Deconvolution reporting software (DRS)*. Food Chemistry, 127 (2011) 1300-1308.
- Savant, R.H., Banerjee K., Utture S.C., Patil S.H., Dasgupta S., Ghaste, M.S., Adsule, P.G. *Multiresidue analysis of 50 pesticides in grape, pomegranate, and mango by gas chromatography-ion trap mass spectrometry*. J. Agr. Food Chem., 58 (2010) 1447-1454.
- Schenck, F.J., Brown, A.N., Podhorniak, L.V., Parker, A., Reliford, M., Wong, J.W. *A rapid multiresidue method for determination of pesticides in fruits and vegetables by using acetonitrile extraction/partitioning and solid-phase extraction column cleanup*. J. AOAC Int., 91, 2 (2008) 422-438.
- Silipunyo T., Hongsibsong, S., Phalaraksh C., Laoyang S., Kerdnoi T., Patarasiriwong V., Prapamontol T. *Determination of organophosphate pesticides residues in fruits, vegetables and health risk assessment among consumers in Chiang Mai province, Northern Thailand*. Research Journal of Environmental Toxicology, 11, 1 (2017) 20-27.
- Tang, Q., Wang X., Yu F., Qlao X., Xu Z. *Simultaneous determination of ten organophosphate pesticide residues in fruits by gas chromatography coupled with magnetic separation*. Journal of Separation Science, 37 (2014) 820-827.
- Valencia, E.M., Guerrero, J.A. *Limpieza por cromatografía de permeación por gel en la determinación de residuos de n-metilcarbamatos en fresa*. Rev. Col. Quím., 37, 2 (2008) 161-172.
- Wilkowska, A., Biziuk, M. *Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology*. Food Chemistry, 125 (2011) 803-812.
- Xu, M-L, Liu, J-B, Lu, J. *Determination and control of pesticide residues in beverages: a review of extraction techniques, chromatography, and rapid detection methods*. App. Spect. Rev., 49, 2 (2014) 97-120.
- Yang, X., Zhang, H., Liu, Y., Wang, J., Zhang, Y.C., Dong, A.J., Zhao, H.T., Sun, C.H., Cui, J. *Multiresidue method for determination of 88 pesticides in berry fruits using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry: Determination of 88 pesticides in berries using SPE and GC-MS*. Food Chem., 127 (2011) 855-865.
- Yang, X., Imasaka, T. *Determination of pesticides by gas chromatography combined with mass spectrometry using femtosecond lasers emitting at 267, 400, and 800 nm as the ionization source*. Analytical Chemistry, 90 (2018) 4886-4893.