

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

**ANÁLISIS DE PESTICIDAS
EN MUESTRAS DE ALIMENTOS:
Tratamiento de la muestra y
determinación por LC y GC acopladas a MS.**

Autor: JOSÉ LUIS ESPINOSA RUIZ

Director: Dr. JUAN MUÑOZ ARNAZ

Tutora: Dra. ROSA M^a GARCINUÑO MARTÍNEZ

**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

Septiembre 2018

ÍNDICE

1.- ABREVIATURAS	Pág. 3
2.- INTRODUCCIÓN y OBJETIVOS	Pág. 4
3.- PESTICIDAS	Pág. 6
3.1.- ORGANOCOLORADOS	Pág. 6
3.2.- ORGANOFOSFORADOS	Pág. 8
3.3.- CARBAMATOS	Pág. 9
3.4.- COMPUESTOS BIPYRIDÍNICOS	Pág. 11
3.5.- PIRETROIDES	Pág. 11
3.6.- DERIVADOS DE LA UREA	Pág. 12
3.7.- TRIAZINAS	Pág. 13
3.8.- DERIVADOS DE LA CUMARINA	Pág. 14
3.9.- NITROCOMPUESTOS	Pág. 15
3.10.- PESTICIDAS ORGANOMETÁLICOS	Pág. 16
4.- TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	Pág. 17
4.1.- MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE PESTICIDAS	Pág. 18
4.1.1.- Extracción con disolventes (SE)	Pág. 18
4.1.1.1.- Extracción Líquido-Líquido (LLE)	Pág. 18
4.1.1.2.- Extracción Sólido-Líquido (SLE)	Pág. 19
4.1.2.- Extracción con líquidos presurizados (PLE)	Pág. 20
4.1.3.- Extracción mediante fluidos supercríticos (SFE)	Pág. 21
4.1.4.- Extracción asistida por microondas (MAE)	Pág. 22
4.1.5.- Extracción en fase sólida (SPE)	Pág. 23

4.1.6.- Extracción en fase sólida dispersiva (dSPE)	Pág. 25
4.1.7.- Microextracción en fase sólida (SPME)	Pág. 27
4.1.8.- Extracción mediante barra de agitación (SBSE)	Pág. 28
4.1.9.- Extracción QuEChERS	Pág. 29
4.2. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE PESTICIDAS	Pág. 32
4.2.1. Purificación del extracto	Pág. 32
4.2.2. Concentración del extracto	Pág. 36
5.- DETERMINACIÓN ANALÍTICA	Pág. 42
5.1.- CROMATOGRAFÍA DE GASES - ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS)	Pág. 42
5.2.- CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS - ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS)	Pág. 52
6.- CONCLUSIONES	Pág. 60
7.- BIBLIOGRAFÍA	Pág. 61

1.- ABREVIATURAS.

AED: Atomic Emission Detector.	MRM: Multiple Reaction Monitoring.
APCI: Ionización Química a Presión Atmosférica.	MS: Mass Spectrometry.
CI: Chemical Ionization.	MSPD: Matrix Solid-Phase Dispersion.
DAD: Diode-Array Detection.	NTP: Notas Técnicas de Prevención.
DDD: Diclorodifenildicloroetano.	NPD: Nitrogen-Phosphorus Detector
DDE: Diclorodifenildicloroetileno.	OMS: Organización Mundial de la Salud.
DDT: Diclorodifeniltricloroetano.	PID: Photo-Ionization Detector.
ECD: Electrón-Capture Detector.	PLE: Pressurized Liquid Extraction.
EFSA: European Food Safety Authority.	ppb: parte por billón.
EI: Electron Impact.	ppm: parte por millón.
ESI: Ionización Electrospray.	ppt: parte por trillón.
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.	Q: cuadrupolo.
FID: Flame Ionization Detector.	QqQ: triple cuadrupolo.
FL: Fluorescencia.	SBSE: Stir Bar Sorptive Extraction.
FPD: Photometric Flame Detector.	SE: Solvent Extraction.
FT-ICR: Fourier Transform Ion - Cyclotron Resonance.	SFE: Supercritical Fluid Extraction.
GC: Gas chromatography.	SLE: Solid-Liquid Extraction.
HCB: Hexaclorobenceno.	SIM: Selected Ion Monitoring.
HCH: Hexaclorociclohexano.	SPE: Solid Phase Extraction.
HPLC: High Performance Liquid Liquid Chromatography.	SPME: Solid-Phase Micro-Extraction.
IT: Ion Trap.	TCD: Thermal Conductivity Detector.
IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.	TID: Thermo-Ionic Detector.
LC: Liquid Chromatography.	TOF: Time of Flight.
LLE: Liquid-Liquid Extraction.	UE: Unión Europea.
LMR: Límite Máximo de Residuo.	UHPLC: Ultra High Performance Liquid Chromatography.
LOD: Limit of Detection.	UV: Ultravioleta.
LOQ: Limit of Quantitation.	
MAE: Microwave Assisted Extraction.	

2.- INTRODUCCIÓN y OBJETIVOS.

“Somos lo que comemos”, es la conclusión que extraen los expertos en medicina, nutrición y dietética de los diferentes estudios realizados sobre los hábitos de vida y alimentación.

Este lema pretende indicar que la salud de los seres humanos depende, además de otros factores, de la alimentación en la vida diaria. En consecuencia, es de vital importancia conocer la composición de los alimentos que ingerimos. Así, en ellos encontramos nutrientes esenciales, pero también, entre otras sustancias, medicamentos veterinarios, aditivos, contaminantes, e inevitablemente con mucha frecuencia, pesticidas.

Es por ello que en la sociedad actual preocupa el uso de pesticidas en la agricultura, que son sustancias o mezclas de sustancias destinadas a repeler, destruir o controlar las plagas, regulando el crecimiento de las plantas. Si bien, por un lado es imprescindible la utilización de sustancias químicas que ayuden a proporcionar la cantidad adecuada de alimentos para abastecer las necesidades de la población mundial actual y sus ritmos de vida, por otro lado es importante reconocer que el abuso de estas sustancias químicas puede conllevar graves problemas de salud.

El interés del estudio de la presencia de pesticidas en los alimentos deriva principalmente de la toxicidad que pueden presentar en los seres humanos, pues son cada vez más los casos que relacionan muchas de las enfermedades y muertes actuales de la población con los contaminantes químicos presentes en los alimentos, cuya fuente son las manipulaciones alimenticias antes del consumo.

Según los últimos datos de la FAO (Food and Agriculture Organization), el consumo mundial de pesticidas en 2014 superaba los 3000 millones de kilogramos al año. Teniendo en cuenta que hay aproximadamente 4900 millones de hectáreas cultivables en el planeta, se deduce fácilmente que se emplean alrededor de 0,62 kg por hectárea de terreno (*Hortoinfo, 2018*). China es el país con mayor consumo de pesticidas, en torno a 1800 millones de kg, más de la mitad del consumo total; mientras que Japón es el país con mayor uso de plaguicidas por hectárea de terreno, alrededor de 11,85 kg/hectárea. España, con un volumen de 61 millones de kg, ocupa la séptima posición en el consumo mundial de plaguicidas, empleando una media de 2,30 kg/hectárea; así, en 2016, la industria española de los productos químicos agrícolas facturó 1100 millones de euros en nuestro país.

Cada vez son más numerosas las sustancias empleadas para la producción de alimentos, así como más complejas las matrices de las muestras analizadas. Por ello, existe

una legislación y normativa actualizada que determina, sobre la base de los estudios científicos realizados hasta la fecha, las concentraciones consideradas como límite para la presencia de estas sustancias en la comida o “Límites Máximos de Residuos” (LMR). De este modo, y centrándose en estos estudios científicos y distintos parámetros de estadística y probabilidad calculados, se asegura la salud de la población, intentando no destruir la tan importante pirámide alimenticia. Las empresas relacionadas con el campo de la alimentación deben cumplir toda la normativa vigente, siendo la EFSA (European Food Safety Authority) la encargada de controlar todo ello en la Unión Europea.

Por todo lo anterior, a lo largo de este trabajo se pretende realizar una revisión bibliográfica sobre las principales familias de pesticidas empleadas en la agricultura, así como las metodologías empleadas para su muestreo en matrices alimentarias y las técnicas de análisis. Para ello, se describen en detalle los métodos de extracción y purificación de pesticidas, y tras ello se hablará sobre las cromatografía de líquidos (LC) y gases (GC) acopladas a la espectrometría de masas (MS), que son las técnicas más empleadas en la detección y análisis de los plaguicidas actualmente. Cabe decir que todo lo anterior queda ejemplificado con ayuda de trabajos y artículos encuadrados en los últimos veinte años principalmente, aunque también se han empleado algunos ejemplos relevantes anteriores.

Con este trabajo se pretende cumplir al mismo tiempo con la finalidad de cualquier Trabajo Fin de Máster, que es la de sintetizar y aplicar en algún ámbito de actualidad los conocimientos adquiridos durante el período de estudio del Máster, siendo este caso concreto el del Máster en Ciencia y Tecnología Químicas, en la especialidad en Química Analítica. De igual modo, se colabora con las expectativas personales de ampliar los conocimientos sobre la química en el ámbito de la alimentación, haciendo uso para ello de diferentes conocimientos y ramas científicas además de la Química Analítica.

3.- PESTICIDAS.

Tal y como se ha mencionado en la introducción, los pesticidas o plaguicidas son sustancias o mezclas de sustancias destinadas a repeler, destruir o controlar las plagas, regulando el crecimiento de las plantas.

Los pesticidas se pueden clasificar de distintas maneras; según su función o acción específica, podemos encontrar, entre otros: insecticidas (usados contra insectos), herbicidas (contra las malas hierbas), fungicidas (contra los hongos), rodenticidas (contra roedores), acaricidas (contra los ácaros), molusquicidas (contra moluscos) y nematocidas (contra parásitos de plantas) (*Bartual Sánchez y col., 1984*).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los pesticidas en función de su toxicidad (*World Health Organization, 2010*). Sin embargo, los plaguicidas incluyen compuestos químicos de naturaleza muy variada, por lo que puede resultar más conveniente clasificarlos en función de su estructura química, pues las propiedades físico-químicas influyen en su movilidad y sus efectos en el medio ambiente y en los seres vivos, además de ayudar a su estudio desde el punto de vista de su determinación analítica. Así, en función de dicha estructura química, podemos encontrar varias familias, donde las más destacadas son: organofosforados, organoclorados, carbámicos, tiocarbámicos, derivados de urea, derivados de cumarina, nitrocompuestos, organometálicos, compuestos bipyridínicos, piretroides y triazinas.

La acción de los diferentes pesticidas, y por ello su toxicidad, varía en función de la estructura química y los sustituyentes presentes en cada formulación, así como del tipo de exposición a las sustancias.

A continuación se describen brevemente los más reseñables de estos grupos de plaguicidas desde el punto de vista toxicológico.

3.1.- ORGANOCLORADOS.

Se trata de compuestos orgánicos que presentan cloro en su estructura. Son pesticidas que fueron desarrollados principalmente para controlar las plagas de insectos, y su acción se da a nivel del sistema nervioso, como ocurre con casi todos los insecticidas. Se pueden clasificar en:

- ✓ Derivados de hidrocarburos aromáticos, como por ejemplo: DDT (diclorodifeniltricloroetano), dicofol, metoxicloro, pertano, HCB (hexaclorobenceno) y los ácidos clorofenoxiacéticos.

- ✓ Derivados del ciclodieno, como el aldrín, clordano, dieldrín, endosulfán y heptacloro.
- ✓ Derivados de hidrocarburos alicíclicos: HCH (isómeros α , β y γ del hexaclorociclohexano).
- ✓ Derivados de hidrocarburos alifáticos. Por ejemplo, el metilbromuro y el 1,2-dicloropropano.

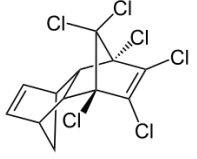
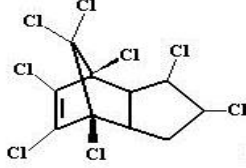
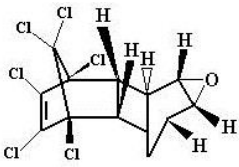
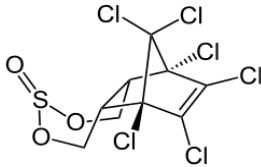
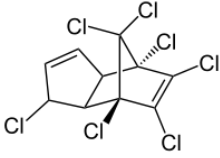
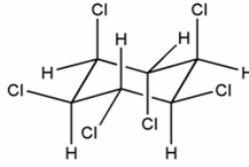
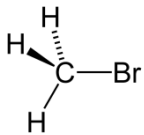
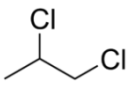
Estos compuestos empleados como insecticidas son poco solubles en agua; por el contrario, son liposolubles, y tienden a acumularse en el tejido graso de los organismos vivos, por lo que tienen gran capacidad de bioconcentración y biomagnificación en la cadena alimentaria, presentando elevada ecotoxicidad; por ello, han sido prohibidos en Europa (DOUE, 2004), así como en otros muchos países del mundo. Además, son estables químicamente, a la luz y de difícil degradación biológica, siendo por ello muy persistentes en el medioambiente (Calva y col., 1998).

Se puede decir, además, que muchos de ellos son integrantes de la llamada “docena sucia”, que engloba a aquellos contaminantes orgánicos persistentes más peligrosos para el medio ambiente y seres humanos (muchos de ellos pesticidas), y que están regulados internacionalmente por el Convenio de Estocolmo desde el año 2004. Inicialmente fueron 12 las sustancias englobadas en esta “docena sucia”, pero posteriormente, y tras sucesivas ampliaciones, son 28 los compuestos o familias de compuestos que se encuentran actualmente regulados por el Convenio (Convenio de Estocolmo, 2017).

En la Tabla 1 se pueden encontrar las estructuras de todos los compuestos organoclorados mencionados en este apartado:

Tabla 1: Estructura de algunos plaguicidas organoclorados.

Estructura química	Nombre	Estructura química	Nombre
	DDT		dicofol
	metoxicloro		pertano
	HCB		ácido clorofenoxi- acético

Estructura química	Nombre	Estructura química	Nombre
	aldrín		clordano
	dieldrín		endosulfán
	heptacloro		lindano (α -HCH)
	metil-bromuro		1,2-dicloro- propano

3.2.- ORGANOFOSFORADOS.

Se trata de un amplio grupo de compuestos orgánicos de síntesis, desarrollados especialmente a partir de la Segunda Guerra Mundial (*Roldán Tapia, 2000*) derivados de los ácidos ortofosfórico (H_3PO_4) y tiofosfórico (H_3PO_3S), por lo que contienen enlaces fósforo-carbono:

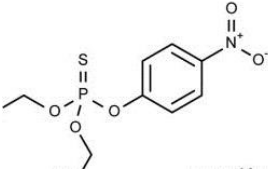
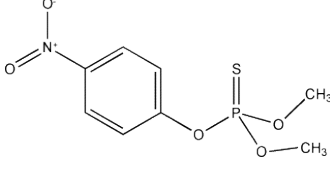
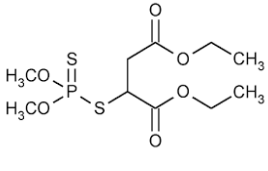
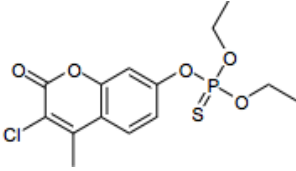
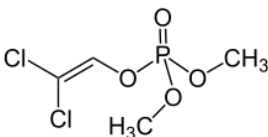
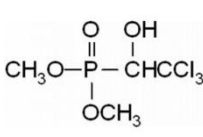
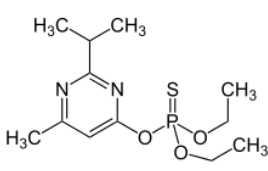
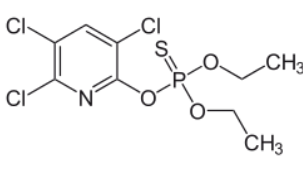


Figura 1: Estructura de los ácidos ortofosfórico y tiofosfórico.

Presentan un marcado carácter apolar, por lo que la mayoría son escasamente solubles en agua y se disuelven en grasas, aunque con grandes diferencias entre compuestos (*Obiols Quinto, 1999*); son poco estables a pH básico y biodegradables, por lo que no tienden a acumularse en los organismos vivos.

Se pueden destacar, por su mayor uso, el paratión, metilparatión, malatión, cumafós, diclorvós, triclorfón, diazinón, y el clorfirifós, todos ellos recogidos en la Tabla 2:

Tabla 2: Estructura de algunos pesticidas organofosforados.

Estructura química	Nombre	Estructura química	Nombre
	paratión		metil-paratión
	malatión		cumafós
	diclorvós		triclorfón
	diazinón		clorfirifós

Los organofosforados son utilizados como alternativa a los hidrocarburos clorados en el control de las plagas. Actúan inhibiendo la actividad de la acetilcolinesterasa, y en consecuencia, paralizando el cerebro del insecto.

A pesar de tener una menor persistencia en el medioambiente y ser más selectivos que los organoclorados, muchos de ellos son altamente tóxicos para los vertebrados y requieren una especial manipulación. Por ello, algunos de estos plaguicidas tienen prohibido su uso a nivel mundial (*Martínez, 2017*).

3.3.- CARBAMATOS.

Son derivados de los ácidos carbámico, tiocarbámico y ditiocarbámico, cuyas estructuras se muestran en la Figura 2:

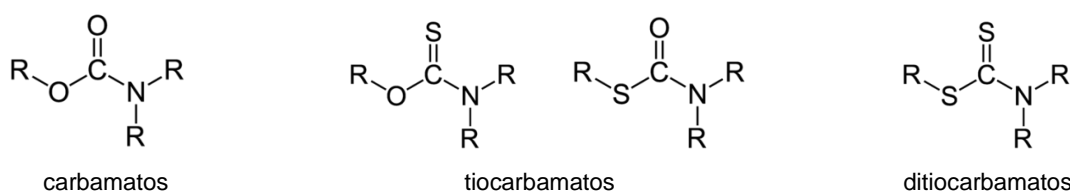


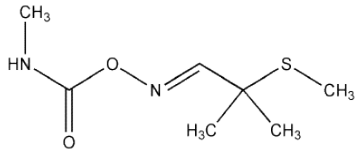
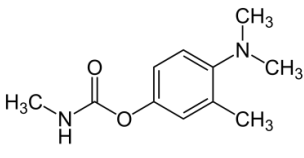
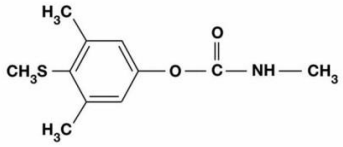
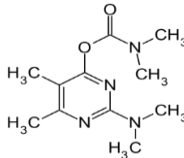
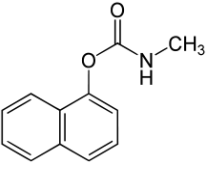
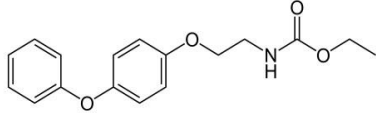
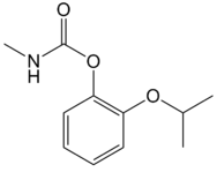
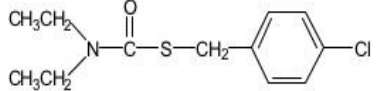
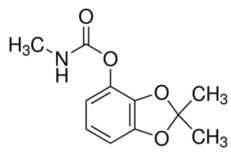
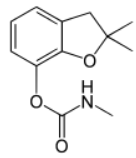
Figura 2: Estructura de los pesticidas derivados de los ácidos carbámico, tiocarbámico y ditiocarbámico.

Ejemplos de plaguicidas carbámicos son el aldicarb, aminocarb, metiocarb, pirimicarb, carbaril, fenoxicarb, propoxur, tiobencarb, fenticarb y carbofurano.

Aunque algunos tiocarbamatos también se aplican como herbicidas y fungicidas, el grupo de los carbamatos se utilizan mayoritariamente como insecticidas de contacto; y, una vez absorbidos por un organismo, inhiben la acción de la colinesterasa e impiden la transmisión de impulsos nerviosos (Roldán Tapia, 2000).

Su actividad está muy influenciada por la posición de los sustituyentes y su estereoisomería. En muchos casos presentan mayor seguridad en su manejo y mayor eficacia que los organofosforados a la par que una toxicidad moderada, baja estabilidad química y nula acumulación en los tejidos; sin embargo, su producción es más difícil, por lo que su empleo se traduce en un mayor coste en comparación al de los organofosforados (Sánchez Martín y col., 1984). Es de destacar también que el uso del aldicarb está prohibido en la UE debido a su toxicidad (Convenio de Rotterdam, Rev. 2013), pues estos pesticidas, a pesar de tener mala penetración en el sistema nervioso, son de rápida acción en el organismo.

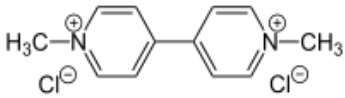
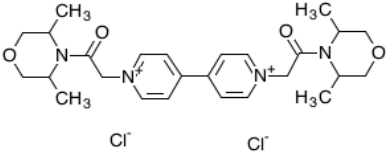
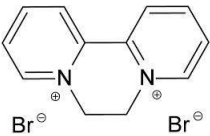
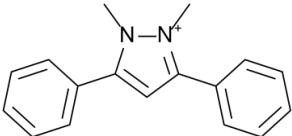
Tabla 3: Estructura de algunos plaguicidas carbámicos.

Estructura química	Nombre	Estructura química	Nombre
	aldicarb		aminocarb
	metiocarb		pirimicarb
	carbaril		fenoxicarb
	propoxur		tiobencarb
	bendiocarb		carbofurano

3.4.- COMPUESTOS BIPIRIDÍNICOS.

Pertencen al grupo de los biperidilos cuaternarios, y por ello se presentan en forma de sales solubles en agua. Ejemplos de este tipo de herbicidas son el paraquat, morfamquat, diquat y difenzoquat:

Tabla 4: Estructura de algunos compuestos biperidínicos.

Estructura química	Nombre	Estructura química	Nombre
	paraquat		morfamquat
	diquat		difenzoquat

Se utilizan como herbicidas de contacto; así, con ayuda de la luz generan radicales que destruyen la membrana de las células vegetales mediante peroxidación lipídica (BVSDE, 2017).

En general se desnaturalizan rápido, por lo que presentan una mínima ecotoxicidad y son muy manejables, aunque se debe tener cuidado por ser peligrosos al contacto. Se debe mencionar, como excepción a estas propiedades, el caso del paraquat, el cual es tóxico para los mamíferos, por lo que su uso está prohibido en muchos países (Ramírez-Muñoz, 2007).

3.5.- PIRETROIDES.

Desde mediados del siglo XIX se sabe que las piretrinas, extraídas de las plantas del género *Chrysanthemum*, son insecticidas naturales (Sector Agropecuario, acceso 1 sept. 2017):

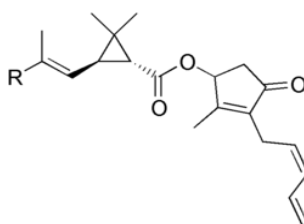


Figura 3: Estructura química de las piretrinas

Si el grupo R- es un metilo (CH_3 -), se tienen las piretrinas de tipo I, que son ésteres del ácido crisantémico. Cuando $\text{R} = -\text{CO}_2\text{CH}_3$, las piretrinas son de tipo II, siendo ésteres del ácido pirétrico.

Las piretrinas actúan sobre el sistema nervioso de los insectos, pero no tienen efectos tóxicos importantes conocidos sobre el ser humano, y son fácilmente degradables al contacto con el aire y por los microorganismos del suelo (ATSDR, 2017). Debido a que estas sustancias se degradan de manera rápida por la acción de la luz y el aire, en las últimas décadas se han sustituido por piretroides sintéticos, que son más estables y con mayor actividad, y más solubles en agua, lo cual se traduce en una mayor persistencia en el medio ambiente y en una mayor toxicidad para insectos y peces. Algunos ejemplos de piretroides sintéticos son el permetrín, el fenvalerato y la aletrina, mostrados en la Figura 4:

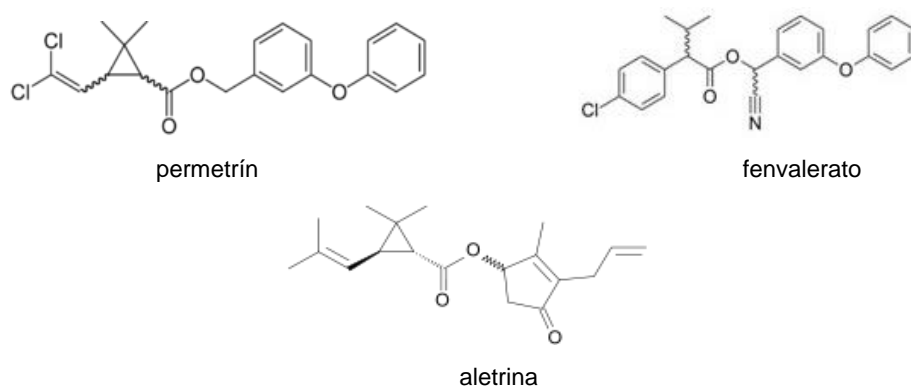


Figura 4: Estructura de algunos compuestos piretroides.

Tanto las piretrinas como los piretroides están considerados entre las sustancias más seguras y utilizadas como insecticidas debido a su fácil degradabilidad (Macías Cabrera y col., 2012), siendo además los piretroides los insecticidas más potentes frente a un amplio espectro de insectos que causan grandes pérdidas económicas (Anadón Navarro, 2015).

3.6.- DERIVADOS DE LA UREA.

Se trata de compuestos que derivan de la urea ($\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$), cuya estructura general se recoge en la Figura 5:

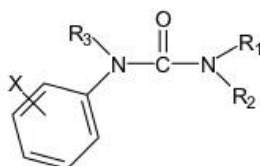


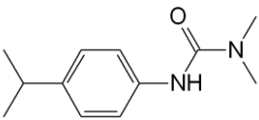
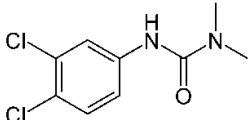
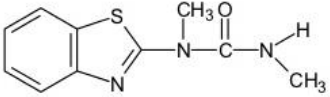
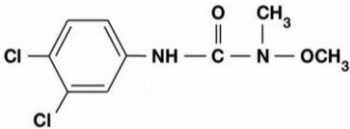
Figura 5: Estructura general de los pesticidas derivados de la urea.

Generalmente, los grupos R_1 y R_2 son metilos, mientras que el grupo R_3 suele ser un protón. Se utilizan principalmente como herbicidas para esterilizar terrenos, y su mecanismo de acción se basa en impedir el proceso normal de fotosíntesis, pues se reduce la fijación de CO_2 y se inhibe la síntesis de glucosa. Su fitotoxicidad aumenta con la presencia de sustituyentes halógenos en el anillo aromático (Sánchez Martín y col., 1984).

En general, se trata de compuestos inestables, pero presentan una actividad residual importante y son selectivos en ciertos cultivos.

Ejemplos de este tipo de compuestos son el isoproturón, diurón, metabenzotiazurón y linurón, tal como se muestra en la Tabla 5:

Tabla 5: Estructura de algunos derivados de la urea.

Estructura química	Nombre	Estructura química	Nombre
	isoproturón		diurón
	metabenzotiazurón		linurón

3.7.- TRIAZINAS.

Estos compuestos heterocíclicos se encuentran entre los pesticidas más antiguamente utilizados en agricultura (Albero Romano, 2008). Su estructura química general es la reflejada en la Figura 6:

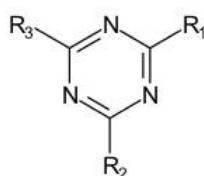


Figura 6: Estructura general de las triazinas.

Sobre la anterior estructura química se pueden adicionar distintos residuos, obteniendo diferentes ejemplos de triazinas, como pueden ser la atrazina, la simazina, la terbutilazina, la terbutrina, la cianazina y la propazina, que aparecen recogidas a continuación en la Tabla 6:

Tabla 6: Estructura de algunas triazinas.

Estructura química	Nombre	Estructura química	Nombre
	atrazina		simazina
	terbutil-azina		terbutrina
	cianazina		propazina

Estas sustancias son poco solubles en agua, poco selectivas, y son fácilmente degradadas en el suelo por plantas y microorganismos. Actualmente siguen siendo herbicidas muy empleados a escala mundial, pues son de amplio espectro al actuar bloqueando la fotosíntesis (*Tuesca, 2017*); pero el empleo de la atrazina está prohibido, (*CORDIS, 2018*), dado que afecta a la fertilidad de vertebrados y contamina las aguas de manera persistente.

3.8.- DERIVADOS DE LA CUMARINA.

La cumarina o 1-benzopira-2-ona (2H-cromen-2-ona, nombre IUPAC), de fórmula molecular $C_9H_6O_2$, es un compuesto químico orgánico perteneciente a la familia de las benzopironas, y su estructura se observa en la Figura 7:

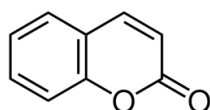


Figura 7: Estructura de la cumarina.

Sobre el esqueleto de la cumarina se pueden adicionar diferentes residuos, formando la familia de las cumarinas (generalmente derivados de la 4-hidroxycumarina), muchos de los cuales son metabolitos secundarios de las plantas (*Ávalos García y col., 2009*). Dichos compuestos son utilizados como rodenticidas.

Los derivados más utilizados, tanto en áreas residenciales, como en industriales y agrícolas, son la warfarina y la bromadiolona, mostradas en la Figura 8:

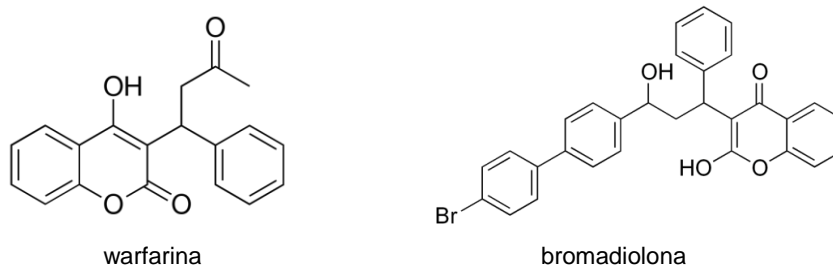


Figura 8: Estructura de la warfarina y la bromadiolona.

Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la producción de factores de coagulación dependientes de la vitamina K, por lo que se reduce la capacidad de la sangre de coagular y genera hemorragias internas (*Vademecum, 2017*).

Cabe destacar que el uso de la warfarina está en declive, pues muchas poblaciones de roedores han desarrollado persistencia a este compuesto; por ello se utiliza más la bromadiolona, conocida también como “super-warfarina”, con gran poder anticoagulante (*Crecente Otero y col., 2012*). Sin embargo, la utilización de bromadiolona en lugar de warfarina presenta una mayor problemática de toxicidad y persistencia, pues es además mucho más soluble en agua.

3.9.- NITROCOMPUESTOS.

Se trata de un grupo de plaguicidas que presentan el grupo $-NO_2$ (grupo nitro); muchos de ellos presentan un solo grupo nitro en su estructura, como los nitrofeniléteres, pero los nitrocompuestos más utilizados son los que contienen dos grupos nitro en su formulación.

Tienen muy baja solubilidad en agua, y se emplean como herbicidas selectivos de preemergencia en cultivos (*Albero Romano, 2008*). El más importante de este grupo de plaguicidas es el 3-metilcrotonato de 2-securil-4,6-dinitrofenilo o binapacril:

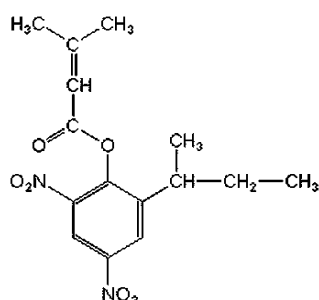


Figura 9: Estructura del binapacril.

Este compuesto se utilizaba como herbicida, pero su uso está prohibido en la actualidad en todas sus formulaciones (*Convenio de Rotterdam, Rev. 2013*), pues es un carcinógeno para los humanos, y muy tóxico para los organismos acuáticos.

3.10.- PESTICIDAS ORGANOMETÁLICOS.

En este grupo de compuestos se encuentran las sustancias orgánicas que contienen algún elemento metálico formando parte de su estructura. Se pueden mencionar como ejemplos los organomercurícos, organocúpricos y organoestánnicos.

Su principal actividad es la de fungicidas, evitando el desarrollo de los hongos que causan enfermedades en las plantas.

Muchos de estos compuestos son solubles en agua, por lo que se comercializan formulados como soluciones acuosas, e incluso mezclados con compuestos inorgánicos con actividad plaguicida (*Routt Reigart y col., 1999*). Los organometálicos utilizados en la actualidad como pesticidas presentan baja toxicidad en humanos; pero, debido a la presencia de metales en su esqueleto, pueden almacenarse en tejidos grasos a la par que pueden presentar actividad residual en el medio ambiente y contaminar reservas de agua (*LENNTECH, 2017*).

4.- TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.

El tratamiento de la muestra es la primera etapa en el proceso global de análisis de pesticidas en muestras de alimentos, y las fases de que se compone, de manera general, aparecen en la Figura 10:

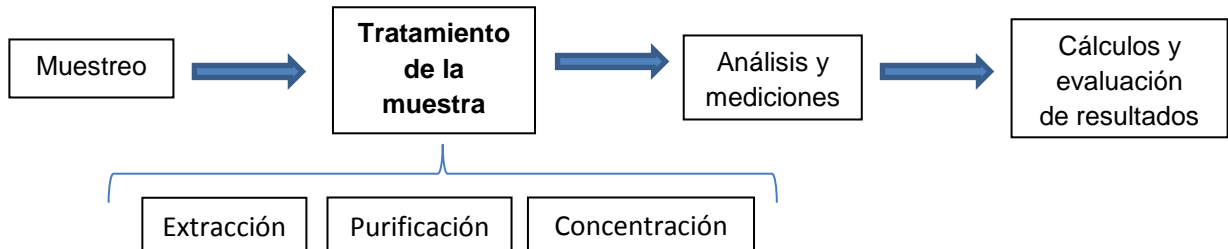


Figura 10: Etapas del proceso analítico.

En los últimos años se han hecho grandes progresos en el análisis de plaguicidas, siendo las cromatografías líquida y de gases acopladas a la espectrometría de masas (LC-MS y GC-MS, respectivamente) las técnicas de detección elegidas por excelencia, dado que cada vez son más rápidas, proporcionan una gran sensibilidad y selectividad, y permiten el análisis de numerosos plaguicidas con diferentes propiedades fisicoquímicas de manera simultánea. Sin embargo, incluso con estas potentes técnicas instrumentales existe riesgo de interferencia de otros compuestos no deseados con los pesticidas en estudio, y este riesgo aumenta con la complejidad del alimento o matriz a tratar (*Lambropoulou y col., 2007*). Es por ello que la etapa de tratamiento y acondicionamiento de la muestra es de extrema importancia, pues de ella depende, en gran medida, el resultado final de todo el protocolo analítico.

Se suma a la relevancia de este paso el hecho de que los residuos de pesticidas hallados en los alimentos se encuentran en cantidades muy pequeñas, del orden del μg por cada kg de alimento, y en matrices, a menudo, muy complejas.

Por tanto, se debe realizar una extracción, purificación y concentración de los plaguicidas presentes en las muestras a analizar para unas mejores detección y cuantificación posteriores. Aquella técnica que maximice la recuperación de analitos y minimice la presencia de interferencias será la más adecuada en cada caso (*Ramírez Milla, 2009*).

4.1.- MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE PESTICIDAS.

La extracción se trata de la primera etapa del proceso de tratamiento y preparación de la muestra. Mediante la extracción, se consigue aislar el analito o analitos de la matriz en que se encuentran presentes, aunque inevitablemente hay muchos otros componentes de la matriz que se extraen de manera conjunta con el analito; dichas interferencias se intentarán eliminar en el proceso de purificación, posterior a la etapa de extracción.

Por tanto, a la hora de elegir un método para la extracción de un pesticida en un alimento, habrá que tener en cuenta tanto las características del compuesto a extraer como la naturaleza de la matriz en que se halla, para así poder maximizar la eficiencia de esta etapa.

A continuación se analizan en detalle diferentes técnicas de extracción utilizadas teniendo en cuenta el tipo de muestra a tratar y los pesticidas presentes.

4.1.1.- EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES (SE).

Las extracciones utilizando disolventes o mezclas de ellos son métodos clásicos de fácil uso, y por ello muy extendidos; además, no requieren de una instrumentación compleja, y eligiendo el adecuado disolvente o mezcla de ellos se pueden extraer multitud de analitos con diferentes propiedades fisicoquímicas. Por contra, emplean grandes cantidades de disolventes, que en su mayoría son orgánicos y por ello tóxicos, requiriendo generalmente etapas de concentración y purificación tras la extracción. También, se requiere de una extrema limpieza para evitar contaminaciones de muestra con residuos que pudieran estar presentes en los materiales de vidrio.

En función de si la muestra a tratar se presenta en estado líquido o sólido, podemos encontrar la extracción líquido-líquido o la extracción sólido-líquido, respectivamente.

4.1.1.1.- EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE).

Mediante la extracción líquido-líquido, el pesticida se reparte entre dos líquidos inmiscibles (la muestra y el disolvente utilizado), según su afinidad por los mismos y las diferentes condiciones experimentales (pH, adición de sales, ...).

Dada la fácil y rápida realización de la LLE, esta metodología es utilizada tanto para extraer directamente los pesticidas a estudiar como para realizar etapas previas a la extracción mediante otros métodos.

La LLE, empleando hexano como disolvente orgánico, se ha utilizado en la determinación del plaguicida clorpirifós en zumos y otros productos de mercado en Estados Unidos, (*Bolles y col., 1999*), obteniéndose resultados satisfactorios. Otros ejemplos se muestran en la Tabla 7:

Tabla 7: Ejemplos de extracción de pesticidas mediante LLE.

Pesticidas	Matriz	Disolvente	Detección	Referencia
Fenitrotión	Vino y arak	Hexano	GC/ELISA	Dagher y col., 1999
Acaricidas (malatión y coumafós)	Miel de colmena	Diclorometano	GC-ECD GC-NPD	Menkissoglu-Spiroudi y col., 2000
11 plaguicidas organoclorados	Miel	Éter / acetato de etilo (8:2)	GC-MS	Tahboub y col., 2006
160 pesticidas	Plantas herbáceas (tomillo, manzanilla, mejorana)	Acetato de etilo / hexano (6:4) + limpieza Florisil®/PSA	GC-MS/MS	Taha y col., 2017

4.1.1.2.- EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO (SLE).

En cuanto a la extracción sólido-líquido, en la que los analitos son transferidos desde la muestra sólida al disolvente líquido utilizado, podemos hallar diversas variantes:

- La extracción sólido-líquido mediante agitación mecánica, en la que la muestra se sumerge en un disolvente orgánico y se agita la mezcla, produciéndose la transferencia del plaguicida desde la matriz sólida hasta el disolvente líquido empleado; tras ello se realiza una filtración y se desecha la fase sólida.

Este tipo de extracción es adecuada cuando el plaguicida es muy soluble en el disolvente, de manera que se transfiere rápidamente a éste desde la matriz.

- Mediante la extracción Soxhlet, la muestra es pulverizada y colocada en un material poroso en la cámara del extractor Soxhlet, de modo que se calienta el disolvente y sus vapores condensados caen sobre la muestra, extrayendo el plaguicida soluble.

Este procedimiento es muy eficiente y se obtienen excelentes recuperaciones, pues el compuesto a extraer se pone en contacto con el disolvente puro y caliente, lo cual favorece su solubilidad; además, no se requiere de filtración posterior. Debido a que la muestra es sometida a elevadas temperaturas, esta técnica se puede utilizar en aquellos casos en que los pesticidas presentan gran estabilidad térmica y baja volatilidad.

- En la extracción asistida por ultrasonidos, la muestra sólida se pone en contacto con un disolvente adecuado y se hace uso de las vibraciones de ultrasonidos para favorecer la extracción del analito a temperatura ambiente. Este procedimiento es rápido, aunque suele requerir de una filtración posterior. Además, se puede aplicar en pesticidas que pueden ser termolábiles; no obstante, hay que tener presente que algunos compuestos pueden degradarse y la eficacia es menor que la de otras técnicas.

En la Tabla 8 se muestran algunos casos de aplicación de la SLE en la extracción de pesticidas sobre muestras alimentarias:

Tabla 8: Ejemplos de extracción de pesticidas mediante SLE.

Pesticidas	Matriz	Extracción	Disolvente	Detección	Referencia
4 Bencimidazoles	Huevos	SLE – Agitación magnética	1-octanol + agente emulsionante	HPLC-DAD	Vichapong y col., 2015
Fenitrotión	Frijoles de Senegal	SLE - Soxhlet	Diclorometano	GC-ECD	Diagne y col., 2002
Organoclorados y organofosforados	Carnes	SLE - Soxhlet	Acetato de etilo	GC-MS	Garrido Frenich y col., 2006
Simazina y atrazina	Miel	SLE - Ultrasonidos	Benceno / Agua (1:1)	–	Rezic y col., 2005
Multitud de pesticidas	Frutas y hortalizas	SLE - Ultrasonidos	Metanol	LC-MS	Ferrer y col., 2005
Cinco herbicidas organoclorados	Peces	SLE - Ultrasonidos	Hexano + limpieza C18 - Diclorometano / hexano (1:1)	GC-ECD	Qu y col., 2017

4.1.2.- EXTRACCIÓN CON LÍQUIDOS PRESURIZADOS (PLE).

Se trata de extracciones en las que se utilizan disolventes presurizados en caliente, de modo que se extraen los pesticidas rápidamente sin la evaporación del disolvente. Para ello, la muestra debe ser previamente triturada y deshidratada (incluso se puede añadir un agente desecante para evitar las interferencias del agua en el proceso extractivo); posteriormente se introduce en un recipiente sellado que contiene el disolvente necesario, y se calienta. Al terminar el proceso se recoge el extracto obtenido para el análisis.

Esta técnica es de mayor eficacia y rapidez que la extracción con disolventes convencional, a la par que es más limpia, pues emplea menor cantidad de solvente; pero es de mayor coste y presenta la desventaja de que no es aplicable en el caso de analitos termolábiles, ya que debido al calor algunos plaguicidas pueden descomponerse. Se ha

empleado en la extracción de 28 pesticidas en frutas y hortalizas (Adou y col., 2001) y otros ejemplos como los que figuran en la Tabla 9:

Tabla 9: Ejemplos de extracción de pesticidas mediante PLE.

Pesticidas	Matriz	Disolvente	Detección	Referencia
organoclorados	Alimentos de alto contenido lipídico (hígado de bacalao y filetes de pescado)	Acetato de etilo / ciclohexano (1:1)	GC-ECD	Weichbrodt y col., 2000
organoclorados	Fresas	Agua / acetona (90:10), 120 °C – 10 MPa	GC-MS	Wennrich y col., 2001
26 organofosforados	Manzana y zanahoria	Acetato de etilo / ciclohexano (1:1), 100 °C – 10 MPa	GC-FPD	Richter y col., 2001
150 plaguicidas	Tubérculos	Acetato de etilo 100 °C – 1400 psi	GC-MS	Khan y col., 2018

4.1.3.- EXTRACCIÓN MEDIANTE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (SFE).

Los fluidos supercríticos son sustancias que presentan propiedades intermedias entre gases y líquidos; de hecho, tienen densidades parecidas a las de los líquidos, pero coeficientes de difusión y viscosidades similares a las de los gases. Además sus propiedades como disolventes se pueden modificar mediante la variación de las condiciones experimentales (presión y temperatura); por ello, la extracción es más rápida que en el caso de disolventes orgánicos, además de que utiliza mucha menos cantidad de disolvente. Este tipo de extracción requiere un secado previo de la muestra.

A continuación, en la Figura 11, se muestra un esquema de las partes de que consta un sistema experimental típico para extracción mediante fluidos supercríticos:

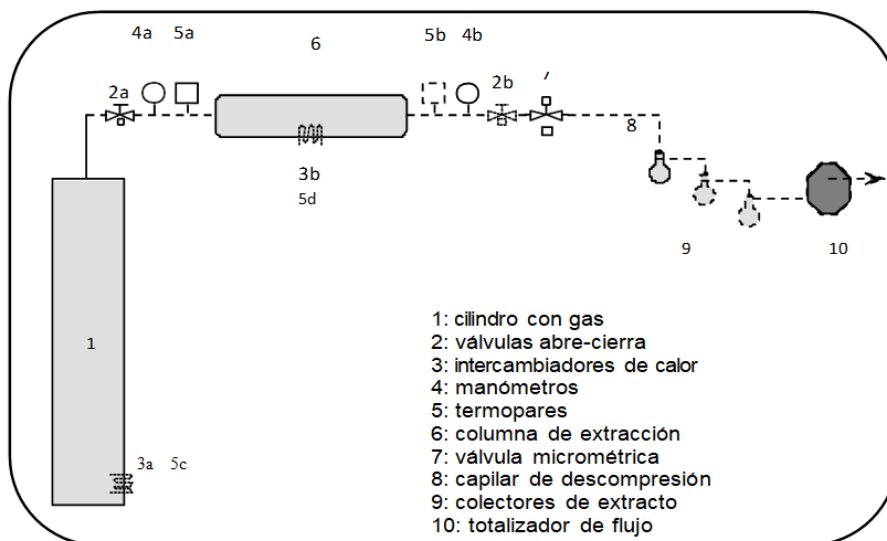


Figura 11: Sistema experimental para la extracción con fluidos supercríticos (Educación en Ingeniería Química, 2017)

El procedimiento consiste en colocar la muestra previamente desecada en la columna de extracción, de modo que se bombea el fluido encerrado en el cilindro controlando la presión y temperatura (mayores que el punto crítico) para alcanzar las condiciones adecuadas y arrastrar a los pesticidas. Al terminar la extracción, se recoge el extracto obtenido en los colectores, que consisten en trampas adsorbentes o en disolventes.

El fluido o disolvente más utilizado en la SFE es el CO₂, debido a que, entre otras cosas, es no inflamable, inocuo y económico, y por encima de su punto crítico se convierte en un potente disolvente; éste es muy útil para extraer analitos no polares, pero ello supone una limitación cuando lo que se quiere extraer son compuestos más polares, en cuyo caso se deben introducir modificadores como el agua, el metanol o la acetona, que aumentan la polaridad y mejoran el rendimiento de la extracción.

En la Tabla 10 se recogen distintos ejemplos de aplicación de la SFE:

Tabla 10: Ejemplos de extracción de pesticidas mediante SFE.

Pesticidas	Matriz	Fluido	Detección	Referencia
Fluvinato	Miel de colmena	CO ₂	HPLC-UV	Atienza y col., 1993
46 plaguicidas	Uvas, zanahorias, patatas, brócoli	CO ₂ (60°C y 320 atm)	GC-MS	Lehotay y col., 1995
Propoxur y otros carbamatos	Carne	CO ₂ , previa extracción con acetonitrilo y tierra de diatomeas (60°C y 329 bares)	LC y GC-MS	Argauer y col., 1995
16 organoclorados	Huevos	CO ₂ (40°C y 680 bares)	GC-ECD	Fiddler y col., 1999
27 pesticidas	Frutas y hortalizas	CO ₂ (40°C y 300 kg/cm ²), modificando el caudal con acetona	HPLC-DAD	Kaihara y col., 2000
25 halogenados, nitrogenados, fosforados y piretroides	Manzanas, uvas, peras y fresas de Brasil	CO ₂ (70°C y 200-450-750 bares), modificado con 10% de acetona y metanol	GC-ECD	Rissato y col, 2005
22 pesticidas	Arroz y trigo	CO ₂ (50°C y 200 atm), modificado con metanol	GC-ECD/NPD	Valverde y col., 2009

4.1.4.- EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE).

Esta técnica consiste básicamente en mezclar la muestra con el disolvente adecuado para su extracción, y tras ello aplicar radiación microondas durante un corto período de tiempo. De esta manera, se produce el calentamiento de la mezcla y se favorece la solubilización de los plaguicidas en el disolvente.

La ventaja que presenta el uso de radiación microondas respecto a otros tipos de extracción en los que se aplica calor, como la extracción Soxhlet, es que se consigue

calentar la mezcla de manera selectiva, a la par que el calentamiento es rápido y eficaz, siendo por ello una extracción más eficiente. No obstante, en la MAE el número de disolventes a utilizar es limitado, pues estos no deben ser transparentes a la radiación microondas (es decir, deben tener momento dipolar), y además se debe poner especial cuidado para no degradar los plaguicidas con el aumento de la temperatura; así, para obtener la polaridad deseada en cada caso, se suelen utilizar mezclas de disolventes polares y apolares en diferentes proporciones, como por ejemplo mezclas de acetona (polar) y hexano (apolar). Al terminar el proceso de extracción, se requiere de una filtración que elimine la matriz inicial presente en la mezcla, y así poder recoger el extracto con el compuesto en estudio.

La MAE ha sido empleada de manera exitosa y obteniendo buenas recuperaciones para extraer fenitrotión presente en frijoles de Senegal, utilizando para ello una mezcla acetona-hexano (1:1) (*Diagne y col., 2002*), donde se compara esta metodología con la extracción Soxhlet y se demuestra que es una alternativa a la misma para este tipo de determinaciones. También se ha empleado en estudios como los que figuran en la Tabla 11:

Tabla 11: Ejemplos de extracción de pesticidas mediante MAE.

Pesticidas	Matriz	Disolvente	Detección	Referencia
Atrazina y organofosforados	Piel de naranja	Acetona / hexano (1:1)	GC-NPD	Bouaid y col., 2000
Tiametoxam, imidacloprid y carbendacima	Repollo, tomates, chiles, patatas y pimientos	Acetona	HPLC-UV	Singh y col., 2004
21 organoclorados	Lechuga, tomate, pimiento, espinaca y patata	Hexano / acetato de etilo	GC-ECD GC-MS	Barriada-Pereira y col., 2005
16 pesticidas organoclorados	Semillas de sésamo	Acetonitrilo / agua (95:5) + limpieza Florisil ®	GC-MS	Papadakis y col., 2006
Tiofanato de metilo y carbendacima	Repollo y tomate	Acetona	HPLC-MS	Singh y col., 2007

4.1.5.- EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE).

Mediante esta metodología, la muestra, generalmente acuosa, se hace pasar por una columna en cuyo interior hay un adsorbente; en dicho material quedan retenidos los pesticidas que posteriormente serán eluidos con una pequeña cantidad del disolvente adecuado o mezcla de ellos. De este modo se obtiene un extracto orgánico concentrado y generalmente limpio para ser analizado directamente.

Generalmente, la extracción en fase sólida presenta cuatro pasos:

- Antes de comenzar la extracción en fase sólida, se realiza el acondicionamiento de la columna, durante el cual se solvata la fase sólida. Esta fase sólida es adsorbente y suele estar constituida por alquilsílicas, fases poliméricas o incluso columnas de intercambio iónico.
- El paso anterior facilita la siguiente etapa de carga de la muestra en la columna, durante la cual los pesticidas de interés quedarán retenidos en la fase sólida adsorbente.
- El siguiente paso es un lavado para la eliminación de las posibles interferencias que estaban presentes en la matriz inicial.
- Por último, se eluye el pesticida o pesticidas con el disolvente adecuado o mezcla de ellos, según la polaridad deseada para el arrastre durante la elución.

Todas las etapas mencionadas anteriormente quedan reflejadas en la Figura 12:

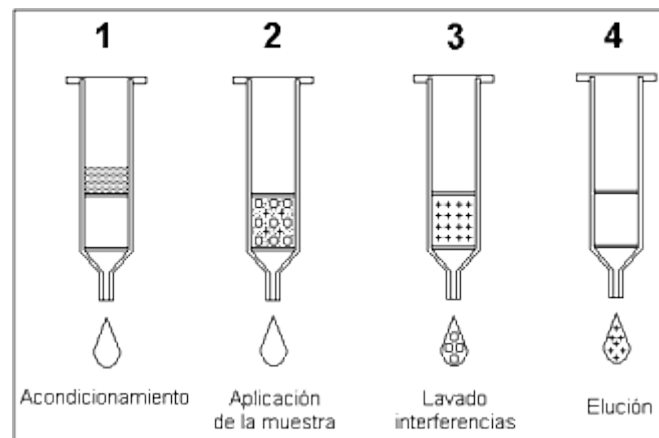


Figura 12: Etapas de la SPE. (Análisis Vínicos, 2017)

La principal ventaja de esta técnica con respecto a los anteriores tipos de extracción es que permite su automatización. Además, puede servir como etapa de purificación tras la extracción de los plaguicidas por otros procedimientos, y se puede acoplar a la LC utilizada para el análisis posterior; también se puede acoplar a la GC, pero en ese caso se requiere la previa eliminación del posible agua presente en el extracto recogido para el análisis.

Existen multitud de trabajos donde se describe el empleo de la SPE, tanto para la extracción como para la limpieza de los extractos obtenidos mediante otros métodos. Así, se pueden citar algunos como la detección de 90 plaguicidas con diferentes propiedades fisicoquímicas en frutas y verduras, donde se realizó una extracción rápida con acetona, una SPE en columna de poliestireno-divinilbenceno para la limpieza y concentración de los pesticidas (en el caso de cereales, espinacas y zanahorias fue necesario realizar una limpieza adicional con sílice modificada con dietilaminopropilo para evitar interferencias de sustancias orgánicas del alimento) y la GC-MS para la detección (Stajnbaher y col., 2003); la

extracción de plaguicidas de distintas familias en bebidas y zumos (*Tadeo y col., 2004*); la determinación de diferentes clases de pesticidas en miel (*Rial-Otero y col., 2007*), donde además se realiza una revisión de otros métodos de extracción y determinación aplicados a la miel como matriz; la determinación de pesticidas en comida para bebés, donde se evalúan y mejoran diferentes metodologías empleadas en la extracción y limpieza (extracción líquida, extracción en fase sólida, extracción en fase sólida dispersiva, extracción con fluidos supercríticos) (*Hercegovca y col., 2007*); y el análisis de diferentes productos de transformación de los plaguicidas en matrices ambientales, alimentarias y biológicas, donde se estudia y observa que los métodos más adecuados para dichos fines son la SPE, dSPE (extracción en fase sólida dispersiva) y PLE, seguidos de una posterior determinación mediante LC-MS (*Martínez Vidal y col., 2009*).

Entre las investigaciones más novedosas y recientes en las que se aplica esta técnica están las que figuran a continuación en la Tabla 12:

Tabla 12: Ejemplos de extracción de pesticidas mediante SPE.

Pesticidas	Matriz	Adsorbente / eluyente	Detección	Referencia
Plaguicidas multiclase	Miel	Tierra de diatomeas / diclorometano	GC-FPD GC-MS	Amendola y col., 2011
60 plaguicidas	Vino tinto de España	Sorbentes poliméricos / metanol	LC-MS	Pérez-Ortega y col., 2012
Diferentes plaguicidas	Refrescos de frutas	Sorbentes poliméricos / metanol	LC-MS	Gilbert-López y col., ag. 2012
Diferentes plaguicidas	Aguas para consumo	Sorbentes poliméricos / metanol-cloruro de metileno (10:90)	GC-MS/MS	Martins y col., 2013
Flubendiamida	Miel	C18 / metanol	LC-MS	Ares y col., 2017

4.1.6.- EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DISPERSIVA (dSPE).

Mediante esta técnica se mezclan íntimamente la muestra y un soporte sólido abrasivo (obtenido de modificar químicamente la superficie de la sílice) en un mortero o por agitación, según la muestra sea sólida o líquida respectivamente; se crea con ello una única fase, que será transferida a una columna para realizar una posterior elución con un disolvente adecuado para el pesticida a extraer.

Los pasos de que consta la dSPE, descritos en el anterior párrafo, se pueden visualizar fácilmente en la Figura 13:



Figura 13: Etapas de la dSPE.

Se pueden elegir dos variantes para el proceso de elución, según interese; así, se pueden eliminar en un primer paso las interferencias que estaban presentes en la matriz inicial mediante un lavado, para después eluir el analito cómodamente utilizando el disolvente adecuado o una mezcla de ellos según la polaridad deseada; aunque también se puede realizar directamente la elución de las sustancias en estudio, quedando retenidas las interferencias en la fase sólida de la columna. Tras ello, el extracto recogido se puede purificar o analizar directamente, según el caso.

La dSPE permite la extracción de compuestos en muestras tanto sólidas como semisólidas y líquidos viscosos. Así mismo, hace uso de pequeñas cantidades de disolvente, mucho menores que las utilizadas en los métodos de extracción clásicos, y la eficacia del proceso es alta debido a la gran superficie de contacto que presenta la fase sólida para el agente eluyente, mayor que en la SPE. Por contra, se deben controlar para un correcto procedimiento el tamaño de partícula, la cantidad de adsorbente (normalmente 4 veces mayor que la cantidad de muestra) y el tipo y cantidad de disolvente.

Este tipo de extracción ha sido utilizada en diferentes casos:

Tabla 13: Ejemplos de extracción de pesticidas mediante dSPE.

Pesticidas	Matriz	Fase dispersiva	Detección	Referencia
5 organoclorados y 5 organofosforados	Leche	Sílice con C18 / acetonitrilo + limpieza Florisil ®	GC-FPD/ECD	Schenck y col., 1995
8 fungicidas	Frutas y hortalizas	Sílice con C18 / acetato de etilo	GC-NPD/ECD GC-MS	Navarro y col., 2002
7 insecticidas carbámicos	Frutas y hortalizas	Arena / agua caliente 50°C	LC-MS	Bogialli y col., 2004
Molusquicida metaldehído	Hortalizas	PSA (previa extracción con acetonitrilo)	HPLC-MS/MS	Zhang y col., 2011
360 plaguicidas	Arroz integral, naranja, espinaca y patata	PSA (previa extracción con acetonitrilo)	GC-MS/MS	Lee y col., 2017

4.1.7.- MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME).

Mediante esta técnica, los compuestos presentes en una matriz de naturaleza líquida o gaseosa quedan retenidos por afinidad en una fibra de sílice fundida que está rodeada de una fase sólida constituida por un material adsorbente, el cual puede ser elegido en función de la naturaleza fisicoquímica de los pesticidas a extraer.

La extracción se puede hacer por el método de inmersión directa de la fibra en un fluido (líquido o gas) o por el método del espacio de cabeza para el caso de pesticidas más volátiles; en este último caso el material adsorbente no está en contacto directo con el fluido, pero retiene las sustancias de interés que se hallan en estado gas debido a su presión de vapor en un recipiente sellado con la muestra líquida.

En la Figura 14 se observan claramente los pasos a seguir para realizar la extracción de la sustancia en estudio de una muestra utilizando el método de inmersión directa de la SPME:

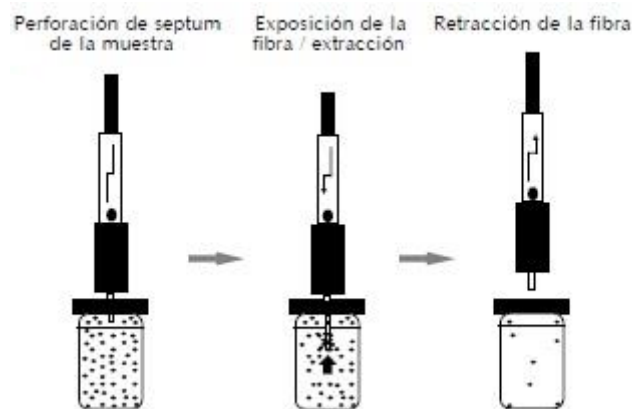


Figura 14: Extracción del analito en la SPME por el método de inmersión directa. (Santa y col., 2002)

Según sea la polaridad de la fase sólida, se retendrán un tipo u otro de pesticidas. Así, por ejemplo, se suele utilizar poliacrilato para la extracción de compuestos polares, mientras que se emplea polidimetilsiloxano para la retención de sustancias apolares.

En multitud de casos se hace necesaria la aplicación de calor para aumentar la velocidad y el rendimiento del proceso de extracción, pero no se debe perder de vista el hecho de que la temperatura podría degradar algunos pesticidas de la muestra. Cabe destacar además que la temperatura no es el único factor a controlar en la SPME, ya que otras variables como el pH, tipo y espesor de la fibra, tiempo de adsorción, el efecto de la matriz, o la adicción de sales, pueden hacer variar la eficacia de la extracción.

La principal ventaja de la SPME frente a los anteriores tipos de extracción es que no necesita usar disolventes. Además, se puede utilizar para la purificación y concentración posteriores a la extracción.

Tras la extracción de los analitos se debe realizar su desorción; este paso se realiza generalmente de forma directa en los equipos de análisis, sin ninguna etapa previa; por tanto, la SPME se trata de una técnica fácilmente acoplable a las cromatografías LC (la desorción se realiza con disolvente) y GC (la desorción es térmica), por lo que es ampliamente utilizada. Algunos ejemplos se recogen en la Tabla 14:

Tabla 14: Ejemplos de extracción de pesticidas mediante SPME.

Pesticidas	Matriz	Fase sólida	Detección	Referencia
21 plaguicidas de diferentes familias	Miel	Poliacrilato Polidimetilsiloxano	GC-ECD	Jiménez y col., 1998
Plaguicidas organofosforados	Pera y zumos de frutas	Polidimetilsiloxano Divinilenceno Poliacrilato	GC-FPD	Simplicio y col., 1999
Fenilureas	Zanahoria, cebolla y patata	Poliacrilato	GC-NPD GC-MS	Berrada y col., 2004
16 organoclorados, organofosforados y piretrinas	Miel	Polidimetilsiloxano	GC-AED	Campillo y col., 2006

4.1.8.- EXTRACCIÓN MEDIANTE BARRA DE AGITACIÓN (SBSE).

En este caso, se hace uso de una barra de agitación recubierta de una fase sólida; así, mediante la agitación de muestras líquidas (generalmente acuosas) con dicha barra, se consiguen retener y extraer los plaguicidas de interés disueltos.

Por tanto, el fundamento es similar al de la microextracción en fase sólida; y, al igual que ocurría con la SPME, se conseguirá retener un determinado tipo de plaguicidas u otro dependiendo de la polaridad del material sólido utilizado para la adsorción. Ya que el material más utilizado comúnmente es el polidimetilsiloxano, los compuestos a extraer tendrán carácter apolar; para retener sustancias polares, se puede realizar una derivatización in situ que disminuya la polaridad de la sustancia en estudio y aumente por ello la eficiencia de la extracción (*Kawaguchi y col., 2006*).

Posteriormente, se requiere de una desorción, y esta puede ser llevada a cabo mediante el uso de disolventes o la elevación de la temperatura; según sea el método elegido, la extracción estará acoplada a la LC o la GC respectivamente. De nuevo, como ocurría en casos anteriores, se debe poner atención para no deteriorar las sustancias extraídas en el caso de la desorción térmica, sobre todo cuando se trata de plaguicidas termolábiles.

La SBSE se ha utilizado con éxito en ejemplos como los recogidos en la Tabla 15:

Tabla 15: Ejemplos de extracción de pesticidas mediante SBSE.

Pesticidas	Matriz	Fase sólida	Detección	Referencia
Fungicidas de dicarboximida	Vinos blancos	Polidimetilsiloxano	GC-MS	Sandra y col., 2001
Más de 300 pesticidas	Frutas, hortalizas y comida para bebés	Polidimetilsiloxano	GC-MS	Sandra y col., 2003
11 organoclorados y organofosforados	Tés de hojas de Passiflora	Polidimetilsiloxano	GC-CD/FPD	Bichi y col., 2003
Plaguicidas organofosforados	Zumos de frutas y verduras	Montmorillonita-polianilina-poliamida	GC-FID	Ayazi y col., 2017

También se ha utilizado para la extracción de varios compuestos organofosforados en 15 mieles comerciales de distinto origen, comparando las metodologías SBSE y SPME con detección mediante LC-MS, para lo cual se utilizó un recubrimiento de dimetilsiloxano en ambos casos y se optimizaron los parámetros, concluyéndose que la SBSE proporciona mejores resultados para el análisis de plaguicidas en muestras de miel, pues muestra mayor capacidad de concentración para los compuestos, así como una mayor precisión y sensibilidad (*Blasco y col., 2004*).

4.1.9.- EXTRACCIÓN QuEChERS

La palabra QuEChERS contiene las siglas de quick, easy, cheap, effective, rugged and safe, lo cual significa rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro. Y el método con tal nombre fue desarrollado en Estados Unidos por Anastassiades y sus colaboradores en 2003 (*Anastassiades y col., 2003*), para determinar residuos de pesticidas en frutas y hortalizas de forma simple y rápida.

El método QuEChERS se basa en la combinación de dos fases, una primera de extracción y una segunda de dSPE:

- En primer lugar, se realiza una **extracción**, con un disolvente miscible en agua (por ejemplo acetonitrilo o acetona), de una pequeña cantidad de muestra representativa de la original. Tras ello, se adicionan sales (cloruro de sodio o sulfato magnésico), con lo cual se produce la separación del líquido en dos fases, de modo que el pesticida se transfiere de la fase acuosa a la orgánica.

Durante todo este proceso se debe tener presente el tipo de muestra a analizar, la naturaleza del disolvente y las sales empleadas, y el pH, pues todos estos factores influyen en la eficacia final de la extracción.

- Al acabar la extracción, se requiere de un proceso posterior de eliminación del agua y purificación, lo cual se realiza generalmente mediante la **extracción en fase sólida dispersiva** (dSPE), ya explicada anteriormente; para ello, se añade un material adsorbente (generalmente una amina primaria y secundaria, también conocida como PSA, que ayuda a eliminar las interferencias de la matriz) y un agente desecante adecuado.

La extracción QuEChERS es una técnica rápida y económica, que utiliza poca cantidad de solventes y reactivos, y requiere de poco espacio y material de vidrio; todo ello va unido a que es un método robusto y fiable, con resultados precisos y de alta calidad, obteniéndose altas recuperaciones aún en el caso de pesticidas polares y solubles en agua.

Algunos trabajos en los que se aplica QuEChERS para la extracción de pesticidas en muestras alimentarias se mencionan en la Tabla 16:

Tabla 16: Ejemplos de extracción de pesticidas mediante QuEChERS.

Pesticidas	Matriz	Extracción / Adsorbente	Detección	Referencia
82 plaguicidas	Uvas	Acetato de etilo + sulfato sódico / PSA	LC-MS/MS	Banerjee y col., 2008
107 pesticidas	Repollo y rábano	Cianuro de metilo + sulfato magnético + cloruro de sodio / PSA	GC-MS	Nguyen y col., 2008
100 pesticidas	Comida para bebés	Ácido acético en cianuro de metilo (1:99) + sulfato magnésico / PSA	GC-MS	Cajka y col., 2008
10 pesticidas	Alimentos con frutas para bebés	Acetonitrilo / PSA	LC-MS/MS	Gilbert-López y col., Nov. 2012
Varios pesticidas	Frutas tropicales	Acetonitrilo / PSA y C18	LC-MS/MS	Botero-Coy y col., 2015
Múltiples plaguicidas	Aceites	Acetonitrilo / Sílice recubierta de circonio	HPLC-DAD	Tuzimski y col., 2016
30 pesticidas	Leche de vaca	Acetonitrilo / PSA + Sílice recubierta de circonio	HPLC-DAD	Rejczak y col., 2017

La metodología QuEChERS también se ha utilizado en diversos trabajos de manera paralela a otras metodologías de las ya descritas anteriormente, para así poder comparar y decidir cuál es el método de extracción más adecuado a cada caso. Ejemplos de estos trabajos son el análisis multirresiduo de 82 plaguicidas en uvas a un nivel igual o inferior a 25 ng/g, donde se realiza una extracción con sulfato de sodio y acetato de etilo, y una posterior dSPE para la limpieza del extracto, analizando los resultados por LC-MS/MS, y observando que el método es una alternativa barata, segura y viable en comparación con otros métodos de análisis de plaguicidas multirresiduo en uva (*Banerjee y col., 2008*); la determinación simultánea de 90 plaguicidas en zumos de frutas (melocotón, naranja, piña, manzana y multifruta), donde se realizó la extracción con acetonitrilo aplicando la metodología QuEChERS sin ningún paso de limpieza adicional y se empleó la HPLC-

MS/MS, analizando el efecto matriz y observando que los resultados eran mejores que cuando se utilizaba el procedimiento SPE (*Romero-González y col., 2008*); y la determinación de plaguicidas multiresiduo en muestras de arroz (mayoritariamente carbendacima, malatión, iprodiona, tebuconazol, quinclorac, tríciclazol en arroz blanco, y buprofezina, hexaconazol, clorfirifós y edifenfós en arroz con cáscara), donde se comparan las principales metodologías de extracción y limpieza (LLE, SPE, dSPE, PLE, SFE y QuEChERS entre otras), y se concluye que los métodos basados en QuEChERS son los más frecuentemente empleados, ya que permiten realizar análisis abarcando un mayor número de plaguicidas en matrices complejas (*Pareja y col., 2011*).

Por último, es importante resaltar el hecho de que es común introducir modificaciones sobre la metodología QuEChERS; es decir, ésta puede estar constituida por una extracción LLE seguida de otro tipo de extracción distinta de la SPE, como puede ser la dSPE. Ejemplos de ello se pueden ver claramente en el artículo de *Gilbert-López y col., 2012*, mencionado en la tabla anterior en el que se combinan la LLE con la dSPE para la extracción de 10 pesticidas en comidas para bebés preparadas a base de frutas; y en el trabajo de *Malhat y col., 2017*, donde se determinaron residuos de fenitrotión en tomates, para lo cual se realizó un procedimiento QuEChERS basado en la combinación de una LLE a base de acetato de etilo y una dSPE con PSA, seguido de una limpieza con carbón grafito y una detección final con GC acoplado al detector fotométrico de llama.

4.2.- MÉTODOS DE PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE PESTICIDAS.

Tras la anterior etapa de extracción, se requiere generalmente realizar una purificación y concentración del extracto obtenido antes de proceder al análisis de los plaguicidas mediante la técnica instrumental elegida. La complejidad de dicha etapa dependerá principalmente de la matriz inicial en la que se encuentran los plaguicidas en estudio, la naturaleza de los propios plaguicidas y de la eficacia del método elegido y empleado para la extracción.

4.2.1.- PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO.

El paso de **purificación** es necesario en multitud de ocasiones; ello se debe a que los alimentos presentan matrices, generalmente, de elevada complejidad de las que se coextraen mezclas de compuestos a menudo con propiedades fisicoquímicas similares y por tanto solubles en el mismo disolvente de extracción, a lo que habría que añadir que las técnicas de extracción nunca son selectivas de un único compuesto.

La co-extracción de otros componentes de la muestra original junto al pesticida o plaguicidas en estudio puede conllevar muchas dificultades en su análisis, siendo el más importante el hecho de que se puede confundir y/o enmascarar la señal analítica del pesticida en cuestión, implicando un aumento del límite de detección del método analítico. Pese a ello, también es importante considerar que una limpieza demasiado exhaustiva de un extracto puede suponer la pérdida de una gran cantidad de analito (*Albero Romano, 2008*).

Como alternativas para realizar la limpieza de los extractos, se emplean normalmente **métodos cromatográficos**, basados en la utilización de un material adsorbente que retiene al plaguicida deseado tras pasar el extracto por el mismo; y tras esta retención, los analitos se tratan de eluir con la mínima cantidad posible del disolvente adecuado, por lo que de este modo se realizan la purificación y una cierta concentración de manera conjunta.

No es de extrañar, por tanto, que otras metodologías empleadas para la extracción, y cuyo fundamento se basa en la retención de compuestos en un material adsorbente, puedan ser empleadas también como métodos de purificación de extractos. Un ejemplo es la SPE, que puede ser utilizada tanto para la extracción como para la limpieza de los extractos, ya que se basa en la adsorción de los plaguicidas por medio de un material selectivo a los mismos; además, se puede variar la polaridad del material adsorbente fácilmente, y con ello se retienen sustancias de diferente naturaleza, discriminando las interferencias. Igualmente

se pueden utilizar, del mismo modo y con tales fines, otros métodos (por ejemplo las extracciones SFE, dSPE, SPME, SBSE y QuEChERS) que conlleven un mecanismo similar de retención final de los pesticidas en el adsorbente adecuado, del cual se desorberán posteriormente mediante elución con el disolvente más apropiado para realizar el paso de detección.

Los materiales que se pueden usar como adsorbentes deben reunir una serie de requisitos, como son tener un gran desarrollo superficial mediante una elevada porosidad, alta capacidad de adsorción, fácil regeneración por desorción, propiedades físicas y tamaño de partícula adecuados (*Textos Científicos, 2017*). Independientemente del método escogido para realizar la purificación, pueden ser de diversos tipos:

- ✓ Polares: para retener pesticidas de carácter polar en diferentes matrices, generalmente disolventes apolares. Ejemplos de estos materiales pueden ser la sílice, la alúmina y el Florisil®. Un caso en el que se empleó alúmina fue en las investigaciones de (*Choi y col., 2016*), donde se determinaron 14 plaguicidas organoclorados presentes en peces, de manera que las muestras de pescado se colocaron sobre alúmina para eliminar las grasas interferentes, y se procedió a la extracción PLE con una mezcla hexano/diclorometano (7:3); también se puede encontrar el uso de Florisil® en el trabajo de *Kaczynski, 2017*, donde se obtuvieron altos rendimientos en la separación de 11 herbicidas de alta polaridad en diversos alimentos de origen vegetal (cebolla, trigo, patata y guisante).

- ✓ Apolares: adecuados para pesticidas apolares disueltos en solventes polares, como por ejemplo las alquil-sílicas (octadecil o C₁₈, octil C₈, ciclohexil, ...). Un caso de aplicación de adsorbentes polares en la purificación se encuentra en la ya comentada determinación de 46 plaguicidas de diferente naturaleza en frutas y hortalizas empleando CO₂ como fluido supercrítico, donde la purificación se realiza con la posterior adsorción en gel de sílice ligado químicamente a octadecilsilano, y tras ello son eluidos con acetonitrilo para una detección mediante GC-MS (*Lehotay y col., 1995*). Otro ejemplo se da en el análisis del insecticida carbámico fenobucarb en productos alimenticios de origen animal (carne de cerdo, huevo, leche entera, anguila, peces planos y camarones), donde se empleó el método QuEChERS que combinaba una extracción con acetonitrilo y una SPE con C18 que servía de purificación previa a la detección cromatográfica (*Zheng y col., 2017*).

- ✓ Poliméricos porosos: como los copolímeros de estireno y divinilbenceno; estas sustancias son estables en intervalos de pH amplios, y por ello permiten purificar extractos con sustancias de diferente naturaleza, tanto polares como apolares. Tal es el caso del Oasis HLB, un adsorbente universal generado a partir de N-vinilpirrolidina (hidrofílica) y divinilbenceno (lipofílico) (*Waters, 2017*); este mismo material se usó para la concentración de muestras de vinos tintos y blancos, tras lo cual se empleó un cartucho de Florisil® para la limpieza y acetonitrilo como disolvente de elución, de modo que se extrajeron 5 pesticidas neonicotinoides que fueron determinados mediante LC-MS/MS (*Rodríguez-Cabo y col., 2016*).

- ✓ Sustancias de intercambio iónico: la mayoría de estos adsorbentes son arcillas, zeolitas y resinas, es decir, compuestos orgánicos de gran peso molecular que tienen la propiedad de disponer de un residuo catiónico o aniónico intercambiable en el cual se produce la adsorción (*Rojas y col., 2017*). Por tanto, son apropiados en el caso de pesticidas iónicos o que son fácilmente ionizables mediante alguna reacción de derivatización; en este último caso, la forma derivatizada es más estable frente a las condiciones de separación, y después se podrá recuperar el compuesto inicial. Un ejemplo de arcilla empleada en la adsorción de sustancias catiónicas es la sepiolita, cuyo mayor yacimiento se encuentra en Madrid (*Ruiz-Hitzky y col., 2007*), y de la cual España es su principal productor (*Suministros Industriales Valladolid, 2017*).

En el trabajo de *Arnnok y col., 2017*, se empleó la zeolita NaY modificada con polianilina para la extracción dSPE de plaguicidas de varias clases (carbamatos, organofosforados, piretroides, neonicotinoides y sulfonilureas) en muestras ambientales y de alimentos de Tailandia (aguas, suelos, miel, coles, pepinos, tomates y fresas), obteniéndose elevadas recuperaciones.

- ✓ Adsorbentes de afinidad: se utilizan materiales con ligandos o grupos específicos adecuados e inmovilizados para retener de manera selectiva los plaguicidas deseados; dicha unión es reversible, al igual que en los demás casos, por lo que el compuesto se podrá recuperar por simple elución con un disolvente adecuado.

Los materiales más usados con tales fines son los polisacáridos, como el gel de agarosa (se suele emplear la sacarosa entrecruzada, conocida como sefarsosa), la celulosa y la dextrana; pero también son utilizados con frecuencia otras sustancias sintéticas como los geles de poli(acrilamida) (*StudyLib, 2017*). Sobre estas sustancias se pueden introducir grupos funcionales y modificaciones para poder extraer los pesticidas

correspondientes. Un ejemplo de aplicación es el estudio del efecto de las avermectinas (compuestos con propiedades insecticidas y acaricidas) sobre la lactoperoxidasa de la leche bobina, donde se empleó sefarosa 4B_L_tirosina-sulfanamida para la purificación de la enzima (Koksal y col., 2016).

- ✓ Carbón: se utiliza normalmente carbón grafitizado para adsorber moléculas polares muy solubles en agua; también se puede emplear carbón activo, ya que es una sustancia muy versátil y heterogénea en cuanto a su química superficial (Mestanza Mateos, 2012), pero éste es menos utilizado por presentar, en numerosos casos, adsorciones irreversibles de los pesticidas. En la investigación de Sarker y col., 2017, se ha empleado carbón activo para sintetizar un carbón poroso dopado con nitrógeno, el cual ha servido para la extracción y eliminación de los herbicidas diurón y ácido 2,4-diclorofenoxiacético encontrados en agua, obteniendo eficiencias notables.

Como últimas tendencias, se están investigando y empleando los nanotubos y las nanofibras de carbón, pues son menos sensibles a los cambios de pH y de temperatura que otras sustancias, y contienen elevadas superficies específicas que conllevan altas capacidades de adsorción (Mestanza Mateos, 2012). Un ejemplo donde se aplica este tipo de materiales se observa en la determinación del fungicida fluazinam en verduras (col, pepino, tomate, espinaca y calabacín), en donde los extractos obtenidos por metodología QuEChERS se purificaron empleando la dSPE con nanotubos de carbono de paredes hidroxiladas como adsorbente (Li y col., 2017).

- ✓ Polímeros de impresión molecular (MIP): estos polímeros son sustancias obtenidas a partir del compuesto empleado, y contienen huecos selectivos al mismo (Cámara y col., 2002). Esta clase de sustancias se han empleado, por ejemplo, en la limpieza de pesticidas derivados de la urea presentes en los extractos obtenidos de hortalizas (zanahoria, patata, maíz y guisantes), donde con tal fin se prepararon dos polímeros MIP usando ácido trifluorometacrílico y linurón o isoproturón (Tamayo y col., 2005). También se puede mencionar el ejemplo en el que se sintetizó un MIP para la extracción del fungicida fenarimol en matrices alimentarias (Khan y col., 2016); y el estudio en el que se sintetizó un MIP selectivo para los pesticidas organofosforados triclorfón y monocrotofos encontrados en peras, manzanas y fresas, empleando la metodología SPE-HPLC (Li y col., 2017).

4.2.2.- CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO.

En relación a la etapa de **concentración**, ésta consiste básicamente en la eliminación de gran parte del disolvente para que el pesticida quede disuelto en la menor cantidad posible, y con ello poder realizar una mejor detección en el paso posterior de análisis instrumental.

Es importante resaltar el hecho de que la purificación y concentración se pueden realizar en un mismo paso; ello significa que el empleo de sustancias adsorbentes para la retención de plaguicidas y su consiguiente elución pretenden conseguir ambos fines de purificación y concentración en esta etapa del proceso de análisis.

No obstante, en muchos casos la etapa de concentración se debe realizar de manera independiente por no conseguirse de otro modo. Y como método elegido principalmente para dicha concentración se encuentra la **evaporación del disolvente** mediante calentamiento, siempre poniendo especial cuidado en no deteriorar los analitos de interés, pues muchos de ellos son termolábiles; en tal caso, se puede realizar una concentración a vacío que no dañe los compuestos, o incluso una concentración con ayuda de un flujo de nitrógeno, tal como ocurría en el trabajo ya mencionado de *Rissato y col., 2005*, donde tras una extracción de pesticidas multiclase en muestras de frutas mediante SFE con CO₂ modificado con acetona y metanol, se realizó una limpieza con cartucho de aminopropil y concentración de los pesticidas por flujo de nitrógeno.

Pese a todo, se debe destacar que esta etapa de purificación y concentración, tal y como se ha mencionado en el apartado anterior, depende del método elegido para la extracción; así, aunque muy frecuentemente es necesaria una purificación para evitar interferencias en la detección, en algunos protocolos no se requiere la etapa de limpieza por poder obtenerse extractos bastante puros y concentrados, fácilmente analizables, lo que supone un ahorro de esfuerzo, dinero y tiempo.

Examinando las diferentes metodologías empleadas en el análisis de pesticidas podemos observar que uno de los principales factores que influyen en la etapa de limpieza es generalmente, aunque no siempre, el método elegido en la extracción, y con ello se pueden hacer las siguientes observaciones:

- En la extracción LLE, debido al excesivo consumo de disolvente, se requiere casi siempre de una etapa de concentración del analito; además, si mediante la extracción se separan de manera conjunta especies no deseadas con propiedades fisicoquímicas similares a las del plaguicida deseado, la etapa de purificación se puede realizar junto a la

concentración a través de un solo paso; y con tal fin se deberá emplear un adsorbente adecuado al pesticida/s en estudio

Hay casos en los que no se necesita una etapa posterior de purificación, como ocurre en el trabajo de *Timofeeva y col., 2017*, donde se desarrolló un método automatizado para la determinación de cuatro plaguicidas (malatión, diazinón, imidacloprid y triadimefón) en jugos de frutas y bayas, realizándose la extracción líquido-líquido mediante una mezcla acetonitrilo-agua a la que se agregó glucosa para la separación de fases, de modo que la LLE se acopló directamente al sistema de detección HPLC-MS/MS, presentando buenos resultados. Pero en otras muchas situaciones se requiere de una posterior etapa de purificación, como ocurre en el estudio de *Fang y col., 2017*, donde se determinaron varios plaguicidas (diclorvos, pirimicarb, fenitrotión, malatión, diazinón y propoxur, entre otros) en aceites mezclados, para lo cual se empleó la LLE en combinación con la dSPE. Habitualmente la LLE puede conllevar una purificación posterior mediante SPE, y ambas técnicas suponen conjuntamente la base de la metodología QuEChERS ya estudiada.

- En la extracción SLE ocurre lo mismo que en la LLE desde la perspectiva de un consumo elevado de disolvente, por lo que se requiere de una limpieza cromatográfica con el adsorbente apropiado en muchos casos, desechando de este modo el resto del extracto. Ejemplos de ello se observan en la determinación de residuos de pesticidas organoclorados (HCH, DDT, endosulfán, aldrina, heptacloro y dicofol) en carne de cabra, donde se realizó una extracción soxhlet con una mezcla a partes iguales de hexano y acetona, y el extracto se purificó mediante cromatografía en columna de Florisil® para la posterior detección de los analitos mediante GC-ECD (*Singh y col., 2015*); y en la ya vista extracción de cinco herbicidas de tipo amida en muestras de peces mediante SLE asistida por ultrasonidos, donde se realizó una posterior limpieza utilizando una columna C18 antes del análisis por GC-ECD (*Qu y col., 2017*).

Además, en el caso de la extracción con agitación mecánica y en la asistida por ultrasonidos, se requiere de un paso de filtración previo a la etapa de adsorción, ya que es necesario separar los restos sólidos de la matriz inicial. Ello se puede observar en la investigación de *Caballo-López y col., 2003*, donde para la extracción de N-metilcarbamatos de suelos y alimentos se emplea la SLE asistida por ultrasonidos, la cual se encuentra acoplada en línea, entre otros pasos posteriores, a una filtración.

- En la extracción PLE, se emplean volúmenes relativamente reducidos de disolventes, siendo un proceso eficiente que no necesita de una etapa de filtración posterior.

Pero, por el contrario, es poco selectiva, y ello hace que se requiera de una limpieza cromatográfica tras la extracción; aunque si se adiciona el adsorbente adecuado a la célula de extracción, se pueden conseguir una separación, purificación y concentración conjuntas. Este hecho se puede observar en el ya comentado trabajo de *Choi y col., 2016*, donde se determinaron varios plaguicidas organoclorados en peces, realizando una extracción PLE con una mezcla hexano/diclorometano tras colocar las muestras de pescado sobre alúmina para eliminar las grasas que pudieran interferir en la posterior detección y análisis.

No obstante, hay situaciones en las que se obtienen extractos bastante puros que pueden analizarse directamente sin necesidad de etapas de limpieza; un ejemplo es la determinación de 11 fungicidas en el bagazo de uva blanca, donde se realizó un procedimiento PLE cuyos extractos se analizaron directamente en el cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, alcanzándose altas recuperaciones (superiores al 80% en todos los casos) (*Celeiro y col., 2014*).

- La extracción SFE es altamente selectiva; en ella, tras la movilización del pesticida con el fluido supercrítico, generalmente CO₂, el compuesto se recoge en un adsorbente adecuado. Y esta adsorción, con la consiguiente elución del pesticida para pasar a la etapa de análisis, supone de hecho la etapa de purificación y concentración en la mayoría de los casos.

Algunos ejemplos de extracción SFE, ya comentados en el apartado “4.1.- Extracción de pesticidas”, en los cuales se emplean diferentes materiales para la adsorción y se obtiene extractos suficientemente puros para poder ser analizados directamente, son: la determinación de propoxur y otros carbamatos en carne, realizándose una extracción con acetonitrilo y adsorción en tierra de diatomeas granuladas para eliminar las especies interferentes de manera previa a la separación con CO₂ como fluido supercrítico (*Argauer y col., 1995*); el análisis de 16 plaguicidas organoclorados en huevos empleando CO₂, de modo que se recogen y purifican los analitos en un cartucho con Florisil® para después eluirlos con acetona/hexano y realizar su detección (*Fiddler y col., 1999*); y la determinación de 25 compuestos seleccionados pertenecientes a cuatro clases de pesticidas en muestras de frutas de Brasil, empleando CO₂ modificado con 10% de acetona y metanol, con una purificación fundamentada en la recolección de los pesticidas en un cartucho de aminopropil, y su posterior elución con distintas mezclas acetona/hexano y acetato de etilo/hexano, realizando el análisis por GC-ECD tras una preconcentración con flujo de nitrógeno (*Rissato y col., 2005*). Un ejemplo más reciente es la extracción de tres residuos de pesticidas piretroides (fenpropatrina, cihalotrina y fenvalerato) a partir de muestras de frutas y verduras,

donde se aplicó la SFE y los analitos extraídos se preconcentraron posteriormente con ayuda de un nuevo adsorbente magnético modificado con un líquido iónico, analizándose posteriormente mediante HPLC-UV (*Bagheri y col., 2016*).

- La extracción MAE, a pesar de ser rápida y tener un consumo bajo de disolvente, es poco selectiva, y extrae simultáneamente varias especies; además requiere de una filtración previa a la limpieza mediante un material adsorbente.

En el trabajo de *Barriada-Pereira y col., 2005*, se lleva a cabo una extracción asistida por microondas donde es necesaria una purificación tras la extracción: así, se determinaron 21 plaguicidas organoclorados en verduras y hortalizas de La Coruña (lechuga, pimiento, tomate, espinaca y patata), realizándose una limpieza del extracto obtenido mediante SPE con carbón, y eluyendo con una mezcla hexano/acetato de etilo para proceder finalmente a la detección mediante GC-ECD y GC-MS. También se puede mencionar el caso de la determinación de 16 insecticidas organoclorados en tejido de mejillón obtenido de acuiculturas de Grecia, para lo cual se realizó una extracción asistida por microondas empleando acetonitrilo, seguido de una etapa de SPE con Florisil® para la purificación del extracto y una detección mediante cromatografía gaseosa acoplada al espectrómetro de masas (*Papadakis y col., 2014*).

- La extracción SPE, tal como se ha mencionado anteriormente, es uno de los métodos más empleados en la purificación de extractos; debido a la gran variedad de adsorbentes que se pueden emplear y a la capacidad de concentración de los analitos deseados en los mismos. Así, en los casos en los que se aplica dicha metodología para la extracción se suelen obtener extractos bastante puros y concentrados, sin ser necesario ningún paso adicional antes de la detección de los analitos.

Se puede mencionar, como ejemplo de empleo de la SPE con obtención de un extracto limpio, la determinación simultánea de plaguicidas de distintas familias en aguas superficiales para consumo y efluentes industriales, donde se ajustó el pH a un valor de 3 tras la adsorción, y se realizó la consiguiente elución con una mezcla metanol/cloruro de metileno (1:9), para así poder realizar directamente la detección por GC-MS, obteniéndose recuperaciones muy elevadas (*Martins y col., 2013*).

Es interesante recordar que la SPE forma parte de la técnica QuEChERS (basada en las extracciones LLE y SPE), por lo que en realidad está sirviendo en muchos casos como paso de purificación posterior a la extracción LLE. Un ejemplo de extracción de tal tipo se

observa en el trabajo de *Zheng y col., 2017*, donde se realizó la determinación de fenobucarb en productos alimenticios de origen animal, empleando para ello el método QuEChERS que combinaba una extracción con acetonitrilo y una extracción en fase sólida con C18 que servía de etapa de limpieza previa a la detección.

- La metodología dSPE también hace uso de un material adsorbente que está en contacto con la muestra, y tras ello se realiza la elución de los plaguicidas; por ello, se suelen obtener extractos bastante puros que no requieren de limpieza,

Esta metodología se puede emplear también como método de purificación y concentración, utilizando el adsorbente y la mezcla de elución apropiados. Tales son los casos de los trabajos realizados por *Wang y col., 2017*, donde se extrajeron hasta 106 plaguicidas de manera simultánea a nivel de trazas en nueces mediante MAE, seguido de una limpieza en dos etapas combinando la congelación con la dSPE para eliminar la matriz lipídica, con una detección mediante HPLC-MS/MS; y por *Li y col., 2017*, donde se determinó fluazinam en verduras, de modo que las muestras se prepararon mediante la metodología QuEChERS, y se purificaron empleando la dSPE con nanotubos de carbono de paredes hidroxiladas como adsorbente, para proceder al análisis mediante LC-MS/MS.

- La extracción SPME tiene un consumo nulo o muy pequeño de disolvente, y su mecanismo se fundamenta también en el empleo de un adsorbente. La extracción de los plaguicidas se realiza de forma rápida y selectiva; por ello, al igual que ocurría en otras metodologías anteriores, dicho método se puede acoplar directamente a los sistemas cromatográficos para su detección sin ser necesaria la limpieza de interferencias sobre el plaguicida que se está estudiando.

Ejemplos de ello son la determinación de 11 residuos de plaguicidas organofosforados en muestras de verduras (col, col rizada y mostaza), empleando una fibra de poliacrilato para realizar la SPME seguido de GC con detector fotométrico de llama (*Sapahin y col., 2014*); y el aislamiento de pesticidas organofosforados encontrados en suelos y leche bobina, donde se emplea una fibra de polidimetilsiloxano-divinilbenceno para la SPME según el método de espacio de cabeza, la cual se introduce directamente en el equipo de detección GC-FID (*Marín López y col., 2015*).

- La extracción SBSE presenta un fundamento basado en un material adsorbente, al igual que la SPME, por lo que por norma general tampoco se necesitará un proceso de

limpieza exhaustivo si se emplea el adsorbente adecuado al plaguicida que se quiere extraer. Además, este método tiene la ventaja de ser incluso más sensible y preciso que la extracción SPME.

Un ejemplo viene descrito en el estudio realizado por *Sánchez-Ortega y col., 2009*, donde se determinaron con éxito 10 triazinas en muestras de agua subterránea al emplear la extracción mediante barra de agitación acoplada directamente a la GC-MS con desorción térmica. También se aplicó la SBSE en la determinación de 16 plaguicidas en muestras de agua superficial del Lago Albufera de Valencia, empleando para ello una barra de agitación con un recubrimiento de 1 mm de polidimetilsiloxano, y realizando después una desorción líquida con metanol y una detección mediante LC-MS/MS (*Giordano y col., 2009*).

- En el caso del método QuEChERS, al combinar de manera general la LLE con la SPE, se obtienen extractos, a menudo, muy puros, que no requieren de una ulterior etapa de limpieza.

Ejemplos recientes de casos en los que no se necesita purificar el extracto tras la metodología QuEChERS se describen en las investigaciones siguientes, ya estudiadas en el apartado anterior: el análisis de diferentes clases de plaguicidas encontrados en aceites, donde se realizó una LLE con acetonitrilo seguido de dSPE utilizando partículas de sílice recubiertas de circonio, consiguiéndose un extracto puro y una alta recuperación (*Tuzimski y col., 2016*); la determinación simultánea de hasta 30 pesticidas en leche de vaca, empleando para ello acetonitrilo en la extracción LLE y un adsorbente basado en ZrO_2 para el paso de la SPE, obteniéndose un extracto muy puro, sin apenas efecto matriz, con el que se pudo proceder a su detección directa por HPLC con detector de diodos array (*Rejczak y col., 2017*); y la extracción de 28 carbamatos en quesos, donde se obtuvieron extractos muy limpios que podían ser analizados mediante HPLC-MS en tándem (*Hamed y col., 2017*).

Tras la utilización del método QuEChERS, es común que pueda requerirse de una etapa de concentración previa a la detección, como ocurre en el análisis simultáneo de 90 plaguicidas, 16 hidrocarburos policíclicos aromáticos y 22 bifenilos policlorados en miel, donde se realizó un procedimiento QuEChERS basado en una LLE con acetonitrilo y una dSPE empleando PSA y C18, de manera que el extracto obtenido se concentró por evaporación antes de la detección por LC-MS en tándem de triple cuadrupolo y GC-MS en tándem con trampa de iones (*Al-Alam y col., 2017*).

5.- DETECCIÓN ANALÍTICA.

Una vez preparado el extracto con los pesticidas en estudio, el siguiente paso es la detección analítica de los compuestos. Esta etapa comprende las etapas de separación, identificación y/o cuantificación de los pesticidas, que se pueden realizar de manera conjunta mediante el acoplamiento de diferentes técnicas.

Entre estas técnicas instrumentales empleadas en la etapa de detección, encontramos la cromatografía acoplada a detectores selectivos como los espectrómetros de masas; de este modo, la primera realiza la separación de los pesticidas, mientras que los detectores permiten la determinación cualitativa y/o cuantitativa de los mismos (*Ramírez Milla, 2009*).

En nuestro trabajo, teniendo presente lo comentado en el apartado “1. *Introducción y objetivos*”, centraremos los esfuerzos en explicar los acoplamientos entre las cromatografías de gases (GC) y de líquidos (LC) con la espectrometría de masas (MS, Mass Spectrometry).

5.1.- CROMATOGRAFÍA DE GASES – ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS).

La cromatografía de gases (GC), introducida en 1952 gracias a la colaboración de A.J.P. Martín y A.T. James (*Nollet y col., 2011*), permite separar e identificar compuestos volátiles en mezclas complejas, siendo la fase móvil un gas y la fase estacionaria un líquido o un sólido fijos.

Se pueden emplear diferentes detectores en el análisis de trazas de pesticidas; así, el detector de captura electrónica (ECD) se emplea en el caso de compuestos con grupos funcionales electronegativos (halógenos, dobles enlaces, grupos nitro); el detector termiónico (TID) o de nitrógeno-fósforo (NPD) se utiliza cuando los pesticidas poseen átomos de nitrógeno o fósforo (triazinas y organofosforados) (*Albero Romano, 2008*); y el detector fotométrico de llama (FPD) se emplea para el análisis de compuestos que contienen fósforo, azufre y metales (*Carburos Metálicos, 2017*), como los plaguicidas organofosforados, tiocarbamatos y organometálicos. Un ejemplo de aplicación de estos detectores se puede observar en la determinación de acaricidas en miel de colmenas, donde los compuestos se separaron mediante extracción líquido-líquido y se analizaron mediante GC con detectores NPD o ECD (*Menkissoglu-Spiroudi y col., 2000*). También (*Amendola y col., 2011*) emplearon la GC con detector FPD para la determinación de 15 pesticidas organofosforados en miel, previa extracción SPE.

Estos sistemas de detección, sin embargo, presentan la gran desventaja de que la identificación de los pesticidas solamente por sus tiempos de retención es poco fiable, y los resultados se deben confirmar mediante otra técnica analítica, como puede ser la MS (Arrieta Viquez, 2016). Este hecho conduce a que cada vez sea más común el empleo del “detector de masas”, es decir, del **espectrómetro de masas acoplado al cromatógrafo de gases** (Stashenko y col., 2010), y de esta manera se forma la técnica híbrida **GC-MS**. Por un lado, la GC permite separar mezclas muy complejas e incluso cuantificarlas, pero la identificación es complicada, pues solo se dispone de información sobre los tiempos de retención, y por ello se requiere de una base de datos bien completa para poder comparar con los tiempos obtenidos en las muestras investigadas; por otro lado, la espectrometría de masas permite identificar cualquier sustancia, previamente separada, de manera casi inequívoca (Gutiérrez y col., 2012). Como se puede deducir, el acoplamiento entre GC y MS presenta un gran potencial en la determinación de pesticidas, pues supone la suma de las ventajas de las técnicas que están siendo acopladas; es decir, se pueden separar mezclas complejas de plaguicidas mediante cromatografía, para después determinar dichos compuestos a partir de sus espectros de masas.

Basándonos en lo anterior, se puede decir que el detector de masas aporta información estructural a los métodos cromatográficos y supone la ampliación de los campos de aplicación de los mismos. Este aumento de capacidad analítica mediante el acoplamiento de técnicas se dará siempre y cuando dicha unión sea efectiva, lo cual representaba el mayor de los problemas hace unos años, pues hay que tener en cuenta que cada técnica requiere de unas condiciones experimentales que pueden ser diferentes entre sí. Si bien, hay que decir que todas estas diferencias están totalmente superadas a día de hoy, y los cromatógrafos acoplados a espectrómetros de masa se utilizan de manera rutinaria en muchas aplicaciones en multitud de laboratorios.

En relación a la parte cromatográfica y sus condiciones de trabajo, se emplean temperaturas en el rango de 50 a 350 °C, por lo que se trabaja en fase gaseosa. Se utilizan generalmente columnas capilares con diámetros internos iguales o menores de 0,32 mm (Stashenko y col., 2010); las longitudes de las columnas suelen estar comprendidas entre 10 y 60 metros, aumentando la longitud en función de la complejidad, el número de pesticidas de la muestra analizada y la eficacia y rapidez deseadas en la separación. La fase estacionaria que recubre el interior de la columna capilar suele tener un espesor comprendido entre 0,10 y 0,25 μm para diámetros de columna inferiores a 0,32 mm; esta fase se trata de una película de polímero térmicamente estable y preferiblemente de baja polaridad, ya que las fases polares producen mayor sangrado e interferencias en el

resultado y tienen generalmente una vida útil menor. La elección de la fase estacionaria óptima para una determinada aplicación analítica puede ser complicada y se basa también en factores como los tipos de interacciones que presente con los analitos a estudiar. En el caso del análisis de pesticidas, interesan las fases estacionarias de interacción dipolar, como los polietilenglicoles y polisiloxanos sustituidos cianopropílicos y trifluoropropílicos, pues son adecuadas para la separación de compuestos con estructuras básicas a las que se unen diferentes grupos funcionales (*Agilent Technologies, 2018*). En cuanto al gas portador, comúnmente se emplean He, H₂ o N₂; los flujos de arrastre generalmente están comprendidos entre 0,5 y 2 mL/min para las dimensiones de columna indicadas, y deben ser suficientemente bajos como para poder introducir la columna cromatográfica en la cámara de ionización del espectrómetro de masas, que se encuentra a un alto vacío (*Egea Mellado, 2018*).

Todos estos parámetros influyen en la eficiencia de la columna cromatográfica y la velocidad del análisis, y mediante su control se pueden detectar compuestos en concentraciones del orden de ppm, ppb o incluso ppt de forma rápida en muestras reales. Como ejemplo, en el trabajo de *Meghesan-Breja y col., 2015*, en donde se extrajeron diferentes plaguicidas en uvas y tomates mediante el método QuEChERS, se proporcionan las siguientes condiciones experimentales para la GC: cromatógrafo "Agilent 6890", columna "RXi-MS" (Restek, EEUU), dimensiones 30m x 0,25mm x 0,25µm (longitud x diámetro interno x espesor de fase), helio como gas portador con un caudal de 1,2 mL/min, y una rampa de temperaturas en el horno comprendida entre 80 y 330 °C. Los niveles mínimos de plaguicida detectados fueron de 4 ng/mL, esto es, del orden de ppb.

En lo referente a los espectrómetros de masas, se cuenta con la posibilidad de emplear diferentes modos de ionización, siendo los más comúnmente utilizados la ionización con electrones (EI) y la ionización química (CI). Estas formas de ionización son empleadas cuando la fase con la que se trabaja es gaseosa (*CSIC, Jul. 2018*), como es el caso de especies separadas por GC. La CI se utiliza frecuentemente cuando la EI no genera iones moleculares debido a una excesiva labilidad y fragmentación. Como ejemplos, se pueden citar la determinación multiresiduo de pesticidas en frutas (manzanas, uvas, peras y fresas), en la que tras una extracción con CO₂ como fluido supercrítico, una etapa de limpieza con cartucho de aminopropil y una concentración por flujo de nitrógeno, se realizó la confirmación de los plaguicidas mediante GC acoplada a MS con EI (*Rissato y col., 2005*); y la determinación de plaguicidas en aguas subterráneas, donde se empleó la extracción líquido-líquido para aislar los pesticidas, los cuales se determinaron mediante GC-MS con CI como forma de ionización (*Rodríguez Fernández-Alba y col., 2002*).

Los espectrómetros de masas se pueden clasificar en función del analizador que presenten, que es la parte en la cual se separan los iones en función de su relación m/z . Los analizadores de masas más utilizados son:

- El cuadrupolo (Q), donde los iones atraviesan el interior de cuatro barras paralelas y el campo creado en ellas actúa como filtro, de modo que solo algunos iones alcanzarán el detector; es de relativa sencillez, barato, rápido (con tiempos de barrido bajos) y robusto; por ello es muy empleado tanto en MS como en MS en tándem.
- El tiempo de vuelo (TOF): se mide el tiempo que tardan los iones acelerados mediante un campo eléctrico en recorrer una determinada distancia; son interesantes en cuanto a la resolución y exactitud, pues consiguen valores por debajo del ppm, aunque su resolución y reproducibilidad son inferiores a las del cuadrupolo. Pese a ello, es robusto, simple, y presenta un ilimitado rango de medida de masas; además, los análisis son rápidos y se obtienen espectros sencillos.
- La trampa de iones (IT): hace que los iones gaseosos formados bien circulen en una órbita estable o pasen al detector. Presenta elevada sensibilidad y rápida obtención de datos, además de que es robusto, compacto y más económico que el cuadrupolo. Por el contrario, pueden darse interacciones ión-molécula.

En la Tabla 17 se observa un ejemplo de trabajo actual de cada uno de los tipos de analizadores descritos:

Tabla 17: Ejemplos de detección de pesticidas con distintos analizadores de MS.

Pesticidas	Matriz	Extracción	Detección	Referencia
31 plaguicidas	Frutas y verduras	QuEChERS	GC-Q-MS	Barco y col., 2018.
8 pesticidas	Tomate cherry y pepino	QuEChERS	GC-TOF-MS	Meghesan-Breja y col., 2017
Pesticidas organofosforados	Comida para bebés	Microextracción LLE	GC-IT-MS	Notardonato y col., 2018

Se puede hacer mención a otro tipo de analizador, menos empleado debido a que se trata de una instrumentación extremadamente costosa. Se trata del analizador de resonancia ion-ciclotrónica con transformada de Fourier (FT-ICR): se basa en una trampa de iones donde éstos circulan en órbitas bien definidas y circulares por la acción de un campo magnético. Como características destacables, presenta relaciones señal/ruido y velocidad mayores que el resto de analizadores, además de una sensibilidad y resolución elevadas (*Universidad de Alicante, 15 Julio 2018*).

También se puede hacer alusión al analizador denominado "Orbitrap", comercializado por la casa Thermo Fischer, que se basa en la separación de los iones generados en un campo eléctrico oscilante. Respecto al analizador FT-ICR, presenta unas

prestaciones similares en cuanto a la resolución y exactitud de la masa, con la ventaja de no necesitar un superconductor de elevado coste (*Martín Gómez y col., 2018*).

En cuanto a la resolución de los espectrómetros de masas, éstos pueden ser de baja resolución, como los analizadores de masas Q, IT, y TOF lineales; o de alta resolución, como los analizadores ICR, Orbitrap y TOF de alta resolución; la ventaja de estos últimos es que permiten una mayor precisión y exactitud de la masa (alcanzando incluso la identificación inequívoca de la masa exacta del pesticida deseado, con lo que se puede determinar la composición elemental e isotópica), debido a las mayores prestaciones de sus analizadores (*Universidad de Alicante, 27 Julio 2018*). La alta resolución se ha empleado en la determinación de contaminantes y plaguicidas en aguas (*Hernández y col., 2007*), donde los compuestos se separaron por SPME y se detectaron por GC-MS con TOF de alta resolución; el análisis fue rápido, con poca manipulación de muestra, sin consumo de disolvente, y con una excelente sensibilidad, detectándose compuestos no buscados.

En la Figura 15 se muestra un equipo GC-MS con analizador de cuadrupolo simple, de la casa Thermo Fisher Scientific, en el que se puede observar que todas las partes de la cromatografía de gases y la espectrometría de masas vienen integradas ya en un mismo equipo compacto:



Figura 15: Equipo GC-MS ISQ 7000 de cuadrupolo simple (Thermo Fisher Scientific, jul. 2018)

Se pueden encontrar diversas variantes en el **acoplamiento entre GC y MS**, de modo que el equipo puede actuar como detector universal, selectivo o específico:

- Se puede emplear el modo barrido o “full scan”, donde se registran todos los iones en función del tiempo, con lo que se trabaja en modo universal. Este modo de trabajo se empleó en la determinación de 11 pesticidas organoclorados en miel, para lo cual se realizó una extracción LLE, seguida de una limpieza con cartucho Florisil® y detección mediante *full-scan* GC-MS (*Tahboub y col., 2006*).
- También se pueden registrar algunos iones característicos seleccionados previamente, empleando el monitoreo selectivo de iones (SIM, Selected Ion Monitoring), y trabajando

en modo selectivo. Tiene la ventaja de alcanzar mayor sensibilidad que el modo *full scan*, pero no da información sobre componentes inesperados en la muestra (Rodríguez, 2018). Un ejemplo de su uso se observa en la determinación de 107 pesticidas en muestras de repollo y rábano, donde se realizó una extracción QuEChERS y una determinación de los compuestos mediante GC-MS trabajando en SIM y con EI como fuente de ionización (Nguyen y col., 2008).

- En el caso de emplear más de un analizador de masas, configuración conocida como *tándem*, el equipo puede actuar como detector específico (Stashenko y col., 2010). En esta última configuración en *tándem* o MS/MS, se acoplan entre sí dos (o más) analizadores de masas, como por ejemplo tres cuadrupolos (analizador de triple cuadrupolo, QqQ): se origina la ionización química de los plaguicidas en la fuente de ionización, y tras ello el primer cuadrupolo selecciona unos iones determinados que se fragmentan en la celda de colisión (segundo cuadrupolo), y los iones que resultan son seleccionados en el tercer cuadrupolo, para llegar finalmente al detector. De este modo se obtiene un espectro de masas por cada ión resultante del primer espectrómetro, dando lugar a una selectividad y sensibilidad elevadas en muestras complejas, puesto que se eliminan o minimizan en gran medida las interferencias debidas a la matriz (Nácher Mestre, 2011). Aunque esta es una técnica que requiere de instrumentación más costosa, se considera una de las herramientas más útiles a la hora de identificar compuestos en mezclas y determinar la estructura química de sustancias desconocidas. Esta configuración se empleó por ejemplo en el estudio de (Hakme y col., 2017), donde se analizaron 203 pesticidas en distintas frutas y verduras, detectando concentraciones del orden del $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Se debe destacar que, según lo observado en la bibliografía encontrada y estudiada, en la combinación GC-MS, el analizador de masas más habitual es el de cuadrupolo, dadas las características que ya se han comentado antes en su descripción, además de presentar un tamaño compacto, facilidad de manejo y limpieza, fácil acoplamiento al cromatógrafo, y posibilidad de registro de iones positivos y negativos.

En cuanto al fundamento de los equipos QqQ, los más comunes cuando se emplea una configuración en *tándem*, el primer y el tercer cuadrupolos pueden trabajar en modo SIM o *full scan*, mientras que el segundo produce la fragmentación de los iones seleccionados. De este modo, se obtienen varias combinaciones de trabajo:

- Cuando los cuadrupolos 1 y 3 actúan en modo SIM, configuración denominada *Multiple Reaction Monitoring* o MRM, se detectan de forma específica los pesticidas de interés (Egea Mellado, 2018); es decir, el primer cuadrupolo selecciona los iones “padre”

provenientes de la fuente de ionización, en el segundo se produce el fraccionamiento en nuevos iones, y en el tercero se seleccionan los iones “hijo” que se desean detectar; esta configuración se suele emplear con fines cuantitativos o para confirmar la presencia de algún pesticida.

- Otra combinación empleada en QqQ es aquella en que Q1 trabaja en modo SIM, seleccionando un ion determinado, y Q3 en *full scan*, detectando todos sus fragmentos; se emplea para la identificación de pesticidas, así como para la puesta a punto de los métodos de determinación.
- También Q1 puede trabajar en *full scan*, dejando pasar todos los iones, los cuales serán fragmentados y pasarán por Q3 en modo SIM, que seleccionará aquellos de interés. Este modo de trabajo se emplea para la identificación de sustancias y el barrido de pesticidas estructuralmente relacionados.
- Por último, si los dos cuadrupolos trabajan en modo de barrido, seleccionando los rangos de masas deseados, se detectan los iones de dichos rangos, lo cual es útil en la identificación de familias de compuestos (*D'Amico Sistemas S.A., 2013*).

Es fácil deducir, por tanto, que el QqQ permite alcanzar la especificidad requerida para detectar, identificar y cuantificar los pesticidas en muestras muy complejas con muchas impurezas; aunque también pueden encontrarse equipos híbridos que combinan varios analizadores diferentes (*Stashenko y col., 2010*).

Según algunos estudios de comparación entre las determinaciones empleando las técnicas GC-MS y GC-MS/MS (*Cao y col., 2015*), los equipos con analizadores de MS en *tándem* tienen una capacidad cuantitativa más precisa y estable, unos límites de detección y cuantificación más bajos y un rango lineal de detección más amplio; sin embargo, los equipos GC-MS presentan un análisis más rápido y la detección de compuestos no objetivo, por lo que es muy útil para los procesos de cribado previos.

Por tanto, tras la combinación de todas las tipologías de detección anteriores, se abre una gran cantidad de posibilidades a la hora de analizar muestras complejas de pesticidas de diferente naturaleza. Se puede observar cómo la tendencia en la bibliografía se dirige hacia el uso de GC-MS/MS para análisis multiresiduos, ya que este tipo de detección aporta una información mayor, a la vez que los resultados son más fiables. Cuando las muestras son más sencillas, tanto desde un punto de la complejidad de su matriz como del número de pesticidas y otras especies investigadas, es frecuente encontrar hoy en día equipos GC con un único analizador de masas, que en ocasiones por su menor coste es el único al que tienen acceso muchos laboratorios.

En la Tabla 18 se recoge una recopilación de ejemplos ordenados de forma cronológica, algunos ya referenciados anteriormente, en los que se aplica la detección mediante el acoplamiento GC-MS en sus diferentes versiones y modos de trabajo; además, se indican los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) alcanzados en los diversos trabajos en que figuran dichos parámetros:

Tabla 18: Ejemplos de análisis de pesticidas mediante GC-MS.

Pesticidas	Matriz	Extracción	Detección	LOD	LOQ	Referencia
11 organoclorados	Miel	LLE	GC-MS	0,65 – 2,5 µg/kg	2,2 – 7,5 µg/kg	Tahboub y col., 2006
Más de 200 plaguicidas	Alimentos procesados	LLE + limpieza	GC-IT-MS	–	<0,01 µg/g	Makabe y col., 2010
10 pesticidas organofosforados	Puerros	QuEChERS	GC-QqQ-MS/MS	0,07 – 1,5 µg/kg	0,25 – 5 µg/kg	Qu y col., 2010
17 organoclorados y 8 piretroides	Miel	SPE	GC-MS	0,2 – 8 µg/kg	0,5 – 25 µg/kg	Amendola y col., 2011
15 pesticidas	Zumo de manzana	QuEChERS	GC-MS	–	2 – 20 µg/L	Cherta y col., 2013
Distintos plaguicidas	Aguas	SPE	GC-QqQ-MS/MS	0,01 – 0,25 µg/L	–	Martins y col., 2013
11 fungicidas	Bagazo de uva blanca	PLE	GC-QqQ-MS/MS	~ ng/g	–	Celeiro y col., 2014
Distintos plaguicidas	Uvas y tomates	QuEChERS	GC-TOF-MS	0,004 µg/mL	0,01 – 0,05 mg/kg	Meghesan-Breja y col., 2015
208 plaguicidas	Frutas y hortalizas	SPE	GC-qTOF-MS GC-MS/MS	< 5 g/kg	< 10 µg/kg	Cao y col., 2015
182 pesticidas	Arroz, soja y hortalizas	LLE + QuEChERS	GC-TOF-MS	–	10-100 µg/kg	Yi y col., 2016
20 pesticidas piretroides	Vegetales	LLE	GC-MS/MS	2 µg/kg	5 µg/kg	Qu y col., 2017
90 plaguicidas	Miel	QuEChERS SPME	GC-IT-MS/MS	< 20 ng/g	< 60 ng/g	Al-Alam y col., 2017
3 pesticidas organoestánicos	Manzana y col	LLE + SPE	GC-MS	0,01 – 0,05 mg/kg	0,03 – 0,16 mg/kg	Cai y col., 2017
81 pesticidas	Tomates	QuEChERS	GC-MS	2,5 – 6,7 ng/g	7,5 - 20 ng/g	Salmazadeh y col., 2018
124 pesticidas	Licor chino y cáscara de arroz	dSPE	GC-MS/MS	0,03 – 1,5 µg/kg	0,1 - 5 µg/kg	Han y col., 2018
150 pesticidas	Tubérculos	PLE	GC-MS	–	0,1 - 10 ng/g	Khan y col., 2018
5 pesticidas	Leche, huevo, cerdo y pollo	QuEChERS	GC-MS	0,2 – 20 µg/L	0,2 – 10 µg/kg	Qin y col., 2018

Como se ha mostrado, gracias a los detectores MS y MS/MS, es posible determinar rápida y simultáneamente plaguicidas cada vez más numerosos pertenecientes a distintas

familias químicas, lo cual no era posible con los detectores convencionales de GC, como ya se comentó anteriormente.

En la siguiente imagen (Figura 16), a modo de ejemplo, se puede observar el cromatograma resultante de la determinación simultánea de 50 pesticidas en una muestra preparada a partir de una mezcla de patrones. Para la detección se empleó un equipo GC-MS, con una columna cromatográfica de dimensiones 30m x 0,25mm x 0,25µm y (35%-fenil)-metilpolisiloxano como fase estacionaria (“Agilent 122-3832”), y un detector MS trabajando en modo de barrido completo. El método es aplicable a muestras medioambientales, como pueden ser aguas potables destinadas a consumo humano, donde los pesticidas se pueden extraer por el método LLE (Agilent Technologies, 2018):

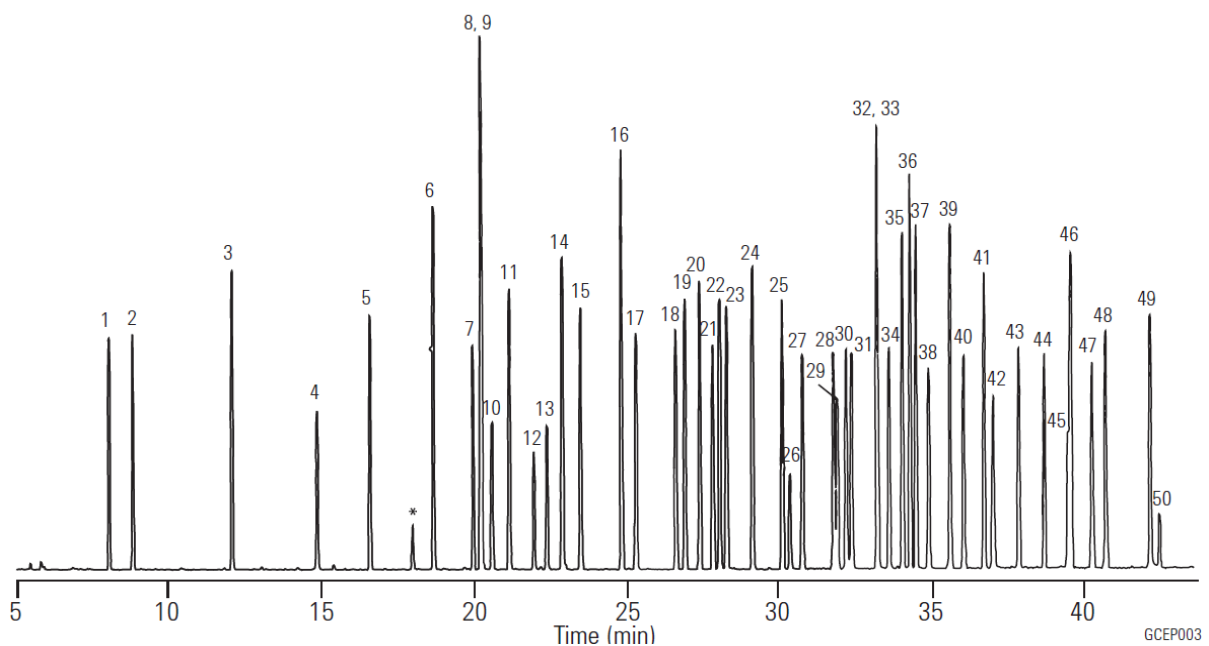


Figura 16: Cromatograma multiresiduo obtenido mediante GC-MS (Agilent Technologies, 2018).

Tabla 19: Pesticidas organoclorados determinados en el cromatograma de la “Figura 2” mediante GC-MS (Agilent Technologies, 2018)

1. 1,2-Dibromo-3-cloropropano	14. Hexaclorobenceno	27. Epóxido de heptacloro	40. Endosulfán II
2. 4-Cloro-3-nitrobenzotrifluoruro	15. α -HCB	28. γ -Clordano	41. p,p'-DDT
3. Hexacloropentadieno	16. Pentacloronitrobenzeno	29. Trans-nonacloro	42. Aldehído de endrina
4. 1-Bromo-2-nitrobenzeno	17. γ -HCB	30. α -clordano	43. Sulfato de endosulfán
5. Etridiazol	18. β -HCB	31. Endosulfán I	44. Dibutilcloroendato
6. Cloroneb	19. Heptacloro	32. Captan	45. Captafol
7. Trifluralina	20. Alacloro	33. p,p'-DDE	46. Metoxicloro
8. 2-Bromobifenilo	21. δ -HCB	34. Dieldrín	47. Cetona de endrina
9. Tetracloro-m-xileno	22. Clorotalonil	35. Clorobencilato	48. Mirex
10. α,α -dibromo-m-xileno	23. Aldrín	36. Pertano	49. cis-Permetrín
11. Propacloro	24. Dacthal	37. Cloropropilato	50. trans-Permetrín
12. Dialato A	25. Isodrina	38. Endrín	
13. Dialato B	26. Dicofol	39. p,p'-DDD	

En lo referente a la **determinación cuantitativa** de los pesticidas mediante GC-MS, ésta puede ser de interés en el caso de encontrar los compuestos buscados en las muestras alimentarias, para así poder observar posteriormente si sus concentraciones están por debajo de los límites permitidos legalmente y asegurar una buena calidad en los alimentos y la salud de la población.

Las moléculas del analito, así como las moléculas de fondo (aire, humedad, disolventes, contaminantes, sangrado de la fase estacionaria, ...), pueden afectar a la reproducibilidad de los resultados. Frecuentemente, se emplean detectores convencionales en GC para la cuantificación; aunque la tendencia predominante es la de emplear equipos de GC-MS libres de fugas y en modo monitoreo selectivo de iones (en los que se disminuye el ruido químico), y los analizadores MS/MS (*Stashenko y col., 2010*).

Así, para llevar a cabo la cuantificación se toman las áreas de los picos cromatográficos, haciendo una calibración previa y conociendo el tiempo de retención de los pesticidas. Pero también, teniendo en cuenta que cada plaguicida presentará un valor único de m/z en el espectro de masas, se puede conocer la concentración de dichas sustancias calculando las intensidades de sus picos espectrales (pues las áreas de los picos son proporcionales a las concentraciones de los compuestos), preparando para ello las curvas de calibrado correspondientes y trabajando en modo SIM.

La cuantificación mediante el detector de masas siempre es la mejor opción, pues presenta gran selectividad y especificidad en muchos casos; también ofrece una relación señal/ruido muy elevada, con lo cual se pueden alcanzar sensibilidades muy altas, del orden del pg (*CSIC, 2018*). Y entre las opciones de acoplamiento de masas, en la "Tabla 3" se observan valores algo inferiores en los LOD y LOQ para la detección mediante MS/MS.

La determinación cuantitativa mediante el detector de masas también permite el empleo de patrones internos marcados isotópicamente, lo que abre las puertas al empleo de la "dilución isotópica". Mediante esta técnica, se añade un trazador o análogo enriquecido al pesticida de interés, el cual presentará las mismas propiedades físicas y químicas; con ello, se produce un cambio en las abundancias isotópicas del pesticida original, lo cual es detectable por espectrometría de masas. En la Figura 17 se refleja este cambio en la abundancia isotópica al añadir un trazador sobre una muestra original (*Pastene Maldonado, 2016*):

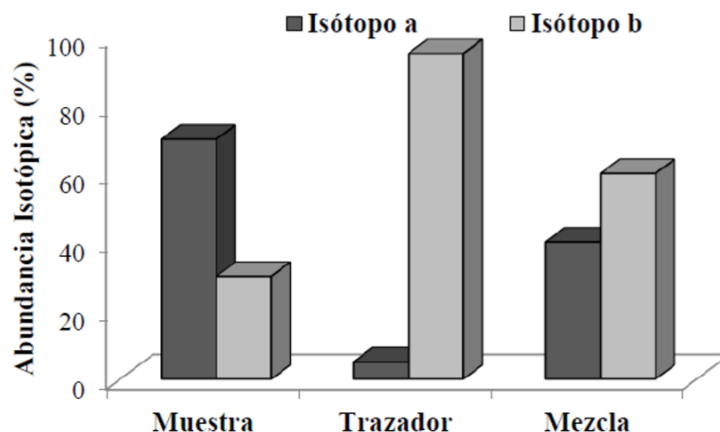


Figura 17: Ejemplo de dilución isotópica (Pastene Maldonado, 2016).

Esta técnica se aplicó en la determinación de 30 plaguicidas organoclorados en alimentos de origen animal, donde las sustancias se extrajeron mediante SPE, se detectaron mediante GC-MS, y se cuantificaron empleando estándares internos isotópicos (Du y col., 2013).

De este modo, es posible determinar la cantidad de pesticida que hay presente en una muestra alimentaria, conociendo previamente las cantidades de muestra y de trazador. Y por todo ello, la “dilución isotópica” se puede considerar como el estándar de oro en cuantificación de cualquier analito en cualquier muestra por espectrometría de masas.

5.2.- CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS – ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-MS)

La cromatografía de líquidos permite determinar analitos que por su falta de volatilidad, su termolabilidad o su polaridad, presentan problemas en el análisis por GC-MS, como ocurre con numerosos herbicidas, insecticidas carbamatos y fenoxiácidos. Por ello, es una técnica extraordinaria para el análisis de gran cantidad de plaguicidas actuales y sus analitos, generalmente polares, complementándose así con la cromatografía de gases.

Su fundamento es el mismo que el de la GC, pero variando el estado de agregación de la fase móvil y los analitos, que en este caso será líquida.

La columna es el elemento principal del equipo LC, y sus características determinarán la eficacia y capacidad de separación. Las más utilizadas para el acoplamiento LC-MS son las de relleno, que consisten en un tubo, generalmente recto y de acero, con una

fase estacionaria. En cuanto a las dimensiones de las columnas, suelen tener longitudes entre 25 y 100 cm, y diámetros internos que oscilan entre 0,5 y 2 mm, con lo que el consumo de disolvente es reducido. La fase estacionaria se elige en función de la naturaleza de los analitos a analizar (en el caso de pesticidas suelen ser alúmina, sílice o resinas de intercambio iónico), y el tamaño de partícula suele ser mayor de 25 μm ; de este modo, la separación de los componentes de la muestra se hace en función de la afinidad por la fase líquida y la estacionaria. (CSIC, 2018).

Se debe recalcar también que, al mejorar los sistemas de inyección de los cromatógrafos de líquidos y disminuir las dimensiones de las columnas, se aumenta la eficacia de la cromatografía, dando lugar a la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) e incluso a la Cromatografía Líquida de Ultra Resolución (UHPLC), presentes en la mayoría de los sistemas actuales. Las diferencias principales entre ellas se deben al tamaño de la columna y de las partículas de la fase estacionaria.

Profundizando un poco más en las condiciones experimentales típicas, las columnas HPLC son de acero inoxidable y presentan diámetros de 2-5 mm y longitudes entre 3 y 25 cm, con tamaños de partícula comprendidos entre 3 y 10 μm ; los flujos de la fase móvil varían entre 0,1 y 10 mL/min (Fernández López, 2018). Sin embargo, la UHPLC emplea columnas de longitud y diámetro interno más pequeños, así como partículas de menor tamaño en la fase estacionaria (inferiores a 2 μm) (Saúl, 2018); con ello se manejan presiones más altas con bombas especializadas, consiguiendo mayor velocidad de flujo y menor consumo de fase móvil, a la vez que menor tiempo de análisis y mayor resolución que la HPLC. Por tanto, en comparación con la HPLC, la UHPLC tiene mayor eficacia y sensibilidad, obteniéndose cromatogramas más cortos y picos más estrechos y con menor ruido (Universidad de Alicante, ag. 2018); por contra, requiere de presiones mayores y su instrumentación es bastante más costosa (Saúl, 2018).

En la publicación de (D'Amico Sistemas S.A., 2013) se puede observar un ejemplo de la columna empleada para la separación de 100 pesticidas en muestras de uvas pasas mediante UPLC-MS/MS; dicha columna ("Waters ACQUITY UPLC BEH C18") presentaba unas dimensiones de 100mm x 2,1mm de longitud y diámetro interno, con partículas de 1,7 μm , y se utilizó con una mezcla de agua/metanol a un caudal de 0,45 mL/min.

La detección por LC puede hacer uso de los detectores convencionales (al igual que la GC), como son el de FL (fluorescencia, detecta solo las sustancias que emiten luz, siendo muy sensible y útil en el análisis de trazas; por el contrario, tiene un rango lineal relativamente limitado y no hay muchos elementos con propiedades fluorescentes), el de UV (Ultravioleta, para sustancias que absorben luz debido a que poseen grupos cromóforos;

son sensibles y versátiles), o el del índice de refracción (poco sensible, pero universal y muy útil para detectar componentes no iónicos). Ejemplos de aplicación de estos detectores para pesticidas se reflejan en la Tabla 20:

Tabla 20: Ejemplos de detección de pesticidas mediante LC con detectores convencionales.

Pesticidas	Matriz	Extracción	Detección	Referencia
Propoxur y carbamatos	Carne	SFE	HPLC-FL	Argauer y col., 1995
12 N-metilcarbamatos	Miel	SPE	LC-FL	Amendola y col., 2011
Fenprotrina, cihalotrina y fenvalerato	Frutas y verduras	SFE	HPLC-UV	Bagheri y col., 2016

Al igual que ocurre con la GC, la **LC puede ser acoplada a la MS**, surgiendo la técnica híbrida **LC-MS**, que proporciona un mayor volumen de información que la LC con detección convencional; esto es, la LC no se utiliza de manera habitual para la identificación, pues se necesita de una gran base de datos para la identificación de compuestos. Además, la LC-MS se trata de una metodología con elevadas sensibilidad y selectividad; y, de nuevo, se presenta un amplio abanico de modalidades en función del tipo de analizador MS escogido.

Es importante destacar los modos de ionización a presión atmosférica del equipo LC-MS, que suponen el punto de unión entre el cromatógrafo de líquidos y el espectrómetro de masas. Así, podemos encontrar:

- Ionización Electrospray (ESI): el químico John B. Fenn consiguió en 2002 el Premio Nobel en Química por el desarrollo del electrospray. Se basa en la ionización de la muestra líquida mediante un voltaje eléctrico, de modo que se forma un spray con gotas cargadas que contiene los compuestos ionizados, los cuales se desolvatarán. Es una ionización suave, ya que no fragmenta las moléculas; además, se produce a partir de muestras en solución líquida, lo cual permite el acoplamiento entre LC y MS (*CBM Severo Ochoa, 2018*).

La ionización ESI se emplea para pesticidas de hasta un elevado peso molecular, muy polares, iónicos o termolábiles con grupos funcionales ionizables (*Rodríguez, 2018*). Un ejemplo de aplicación es el trabajo de *Rodríguez-Cabo y col., 2016*, donde se detectaron cinco pesticidas neonicotinoides en vinos tintos y blancos; para ello, se concentraron los plaguicidas empleando cartuchos de Oasis HLB y Florisil, y se eluyeron con acetonitrilo para una posterior detección mediante LC-MS/MS con ESI como fuente de ionización, alcanzando LOQs de 0,2 µg/L.

- Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI): la muestra líquida pasa a una cámara de vaporización a elevada temperatura, donde se evapora y se ionizan los compuestos

debido a la aplicación de un elevado voltaje. Al igual que la ESI, la APCI es una ionización suave, pues no fragmenta los iones (*Tesis Doctorales en Xarxa, 2018*).

Se emplea para pesticidas de baja polaridad y con algún heteroátomo, neutros, no termolábiles, o para compuestos sin grupos funcionales ionizables (*Rodríguez, 2018*). Un ejemplo de aplicación se observa en el trabajo de *Portoles y col., 2017*, donde se determinaron alrededor de 252 plaguicidas en alimentos para peces, dorada y salmón atlántico; para ello se realizó una extracción QuEChERS de los pesticidas, los cuales se determinaron mediante LC-MS con APCI como fuente de ionización y TOF de alta resolución como analizador, alcanzando LOQs comprendidos entre 0,005 y 0,05 mg/kg.

La LC también se puede acoplar a diversos analizadores de masas, como el Q, TOF y IT, y se puede trabajar en los modos SIM y *full scan*. Un ejemplo de uso de cada analizador se muestra recoge en Tabla 21:

Tabla 21: Ejemplos de detección de pesticidas con distintos analizadores de MS.

Pesticidas	Matriz	Extracción	Detección	Referencia
10 pesticidas	Naranjas	Extracción sólido-líquido	LC-Q-MS	Blasco y col., 2006
60 pesticidas	Frutas y verduras	SPE	UHPLC-TOF-MS	Sivaperumal y col., 2015
12 organofosforados y carbamatos	Miel	PLE, SPE, SPME, QuEChERS	LC-IT-MS	Blasco y col., 2011

Es común el empleo de LC-MS, aunque el acoplamiento **LC-MS/MS** continúa ganando popularidad, y es difícil pensar en un laboratorio de análisis de pesticidas sin este equipo (*Botero Coy, 2016*). Esta técnica en *tándem* permite mayor variedad de modos de trabajo que la LC-MS, reduce o elimina las posibles interferencias debidas a la matriz (*Gilbert-López y col., ag. 2012*), y alcanza unos límites de detección y cuantificación a niveles muy bajos de concentración (del orden del ppb o incluso del ppt), pues tiene muy buenas sensibilidad y selectividad; es de relativa rapidez al escoger el analizador QqQ; también tiene gran exactitud, reproducibilidad y robustez en mezclas complejas, (*D'Amico Sistemas S.A., 2013*), y por ello el tratamiento de la muestra puede llegar a ser mínimo (*Ingeniería Analítica, 2015*).

Como se ha comentado, los equipos actuales de LC-MS/MS pueden determinar de manera fiable cientos de compuestos con una única inyección en el equipo. Como ejemplo, (*Botero-Coy y col., 2015*) emplearon la LC-MS/MS para la detección de múltiples tipos de plaguicidas en frutas tropicales, previa extracción QuEChERS.

Una recopilación de ejemplos ordenados de forma cronológica, algunos ya referenciados antes, donde la detección se realiza mediante el acoplamiento LC-MS en sus diferentes versiones y modos de trabajo se muestra en la tabla 22; además, se indican los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) alcanzados en los diversos estudios en que figuran dichos parámetros:

Tabla 22: Ejemplos de análisis de pesticidas mediante LC-MS.

Pesticidas	Matriz	Extracción	Detección	LOD	LOQ	Artículo
15 pesticidas	Frutas y verduras	SLE / Ultrasonidos	LC-TOF-MS	0,5 – 30 µg/kg	–	Ferrer y col., 2005
660 plaguicidas	Carnes	SLE + Cromatografía en gel	LC-MS/MS	0,2 – 600 µg/kg	1 – 600 µg/kg	Pang y col., 2006
82 plaguicidas	Uvas	LLE + dSPE	LC-MS/MS	0,3-2 ng/g	< 10 ng/g	Banerjee y col., 2008
90 plaguicidas	Zumos de frutas	QuEChERS	UPLC-MS/MS	0,7 µg/L	< 5 µg/L	Romero-González y col., 2008
54 pesticidas	Vegetales y cítricos	LLE	LC-QqQ-MS/MS	0,03-14,9 µg/kg	–	Fenoll y col., 2010
Insecticida spinetoram	Cultivos vegetales	SPE	LC-MS/MS	0,01 ppm	0,03 ppm	Liu y col., 2011
10 fungicidas	Alimentos con frutas	QuEChERS	LC-IT-MS/MS LC-MS	0,5 – 3 µg/kg	–	Gilbert-López y col., nov. 2012
41 plaguicidas	Arroz	QuEChERS	LC-MS/MS	0,008 µg/g	0,025 µg/g	Shakouri y col., 2014.
5 neonicotinoides	Vino tinto y blanco	Concentración + limpieza Florisil	LC-MS/MS	–	< 0,2 ng/mL	Rodríguez-Cabo y col., 2016
90 plaguicidas	Miel	QuEChERS	LC-QqQ-MS/MS	< 20 ng/g	< 60 ng/g	Al-Alam y col., 2017
28 carbamatos	Quesos grasos	QuEChERS	UHPLC-MS/MS	–	< 5,4 g/kg	Hamed y col., 2017
Malatión, diazinón, Imidacloprid, triadimefón	Jugos de frutas	LLE	HPLC-MS/MS	0,3 – 30 µg/L	–	Timofeeva y col., 2017
Acetamiprid	Cereza dulce	QuEChERS	LC-MS/MS	0,5 µg/kg	1,5 µg/kg	Lazic y col., 2018
5 insecticidas neonicotinoides	Hongos comestibles	QuEChERS	UHPLC-MS/MS	0,03–0,7 µg/kg	0,1 – 2 µg/kg	Lu y col., 2018
40 plaguicidas	Quinoa	QuEChERS	LC-MS/MS	–	1 – 10 µg/kg	Vilca y col., 2018

En la siguiente imagen (Figura 18) se puede ver un equipo de LC-MS/MS con analizador de triple cuadrupolo, de la casa Thermo Fisher Scientific:



Figura 18: Equipo GC-MS TSQ Quantis de triple cuadrupolo (Thermo Fisher Scientific, 2018).

A continuación, en la Figura 19, a modo de ejemplo, se puede observar el cromatograma resultante de la determinación simultánea de 94 pesticidas en una muestra de pasas de uva (en la actualidad, esta metodología se ha extendido a la detección de 400 pesticidas en diversas matrices), preparada a partir de la extracción con una mezcla agua/metanol y la limpieza con una columna de tierra de diatomeas. Para la detección de los pesticidas se empleó un equipo UPLC-MS/MS, donde el sistema ionización del MS en *tándem* fue ESI y se trabajó en modo MRM (D'Amico Sistemas S.A., 2013):

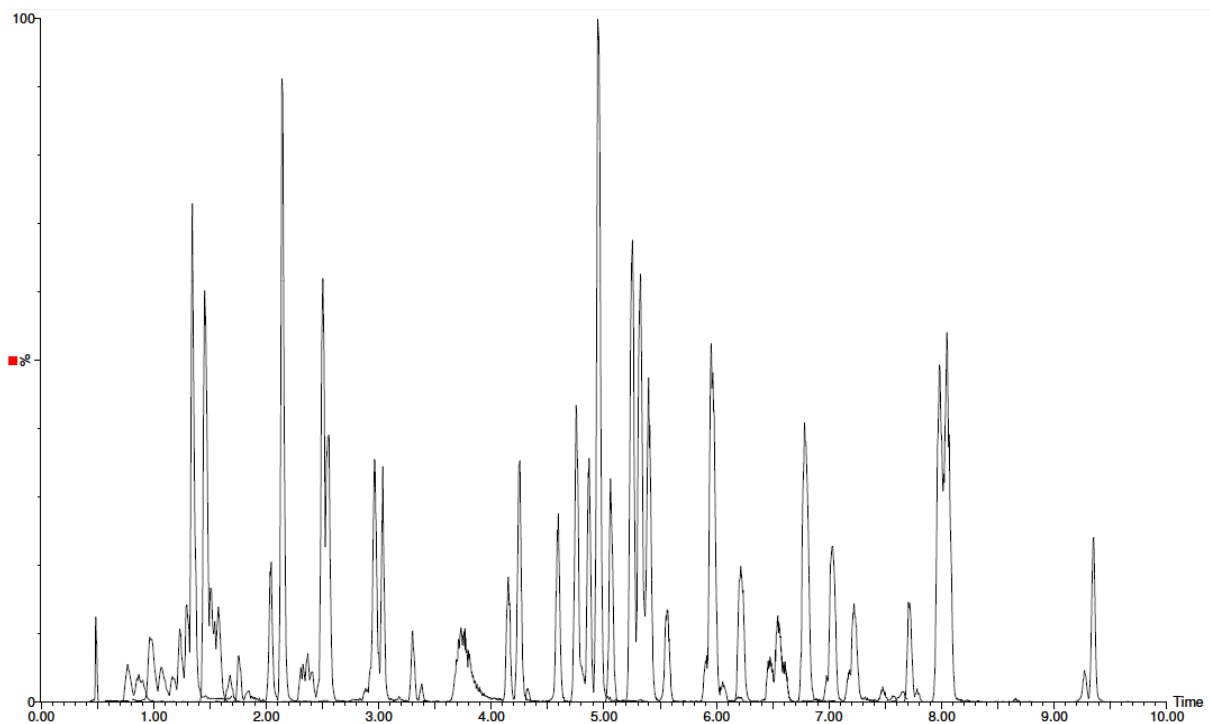


Figura 19: Cromatograma multiresiduo obtenido mediante UPLC (D'Amico Sistemas S.A., 2013).

Tabla 23: Pesticidas determinados en el cromatograma de la "Figura 2" mediante UPLC-MS/MS (D'Amico Sistemas S.A., 2013).

1. 5-Hidroxi-cletodim-sulfona	20. Clorsulfurón	39. Fenpropimorf	58. Metamidofos	77. Quinmerac
2. 6-Cloro-4-hidroxi-3-fenilpiridazina	21. Cinosulfurón	40. Flazasulfuron	59. Metiocarb	78. Quizalofop-etil
3. Acefato	22. Cletodim	41. Florasulam	60. Metomilo	79. Rimsulfurón
4. Aldicarb	23. Cletodim-imin-sulfona	42. Fluazifop-P-butil	61. Metolacoloro	80. Spiroxamina
5. Aldicarb-sulfóxido	24. Cletodim-sulfona	43. Fludioxonil	62. Metsulfuron-metil	81. Tebuconazol
6. Aldoxicarb	25. Cletodim-sulfóxido	44. Flufenoxuron	63. Monocrotofós	82. Tebufenocida
7. Amidosulfurón	26. Ciprodinilo	45. Formetanato	64. Nicosulfurón	83. Teflubenzurón
8. Atrazina	27. Daminozida	46. Furatiocarb	65. Ometoat	84. Tiabendazol
9. Azoxistrobin	28. Demeton-S-metil-sulfona	47. Haloxifop-etoxietilo	66. Oxamil	85. Tiacloprid
10. Bendiocarb	29. Desmedifam	48. Imazalil	67. Oxidemeton-metil	86. Tifensulfurón-metil
11. Bensulfurón-metil	30. Difenzoquat metilsulfato	49. Imidacloprid	68. Fenmedifam	87. Tiodicarb
12. Bromoxinilo	31. Diflubenzurón	50. Indoxacarb	69. Pirimicarb	88. Tiofanox
13. Butocarboxim	32. Dimetoato	51. Ioxinil	70. Primisulfuron metil	89. Tiofanox-sulfona
14. Butoxicarboxim	33. Diuron	52. Iprovalicarb	71. Promecarb	90. Tiofanox-sulfóxido
15. Butoxicarboxim sulfóxido	34. Etiofencarb	53. Isoproturón	72. Propoxur	91. Triasulfurón
16. Carbaril	35. Etiofencarbsulfona	54. Ixosaflutol	73. Prosulfurón	92. Triflumurón
17. Carbendazima	36. Etiofencarbsulfóxido	55. Linuron	74. Pimetrozina	93. Triflursulfurón-metil
18. Carbofurán	37. Fenhexamida	56. Metalaxil	75. Piridato	94. Vamidotión
19. Carbofurán-3-hidroxi	38. Fenoxicarb	57. Metamitron	76. Pirimetanil	

En lo referente a la cuantificación de los pesticidas en estudio, se siguen los mismos pasos que en el caso de la GC-MS, esto es, se emplean las áreas de los picos cromatográficos (bien del cromatograma o bien del espectro de masas, según el método elegido), realizando para ello una previa calibración.

Se puede afirmar que la LC tiene una gran popularidad debido a su alta aplicabilidad a sustancias de interés para la industria y la sociedad, además de que es idónea para la separación de compuestos no volátiles, termolábiles o polares (*Universidad de Alicante, ag. 2018*). Ello, sumado a su acoplamiento a MS y MS/MS, abre un gran abanico de posibilidades de análisis, además de un amplio campo de aplicaciones diferentes, en comparación con la GC, a la hora de analizar pesticidas en muestras alimentarias cada vez más complejas.

Si se comparan las alternativas de detección estudiadas, GC-MS y LC-MS, en la bibliografía se observan multitud de trabajos con GC-MS y LC-MS como métodos de separación y detección, e incluso se emplean ambos métodos en el mismo trabajo.

Por tanto, se debe concluir diciendo que ambas alternativas, GC-MS y LC-MS, son imprescindibles en las operaciones rutinarias de los laboratorios actuales que se ocupan de la determinación de pesticidas en muestras alimentarias. Así, si una empresa se dedica al

estudio de un determinado tipo de pesticidas, podrá quizás disponer de una única técnica (GC-MS o LC-MS) que mejor convenga a esas sustancias en función de sus características; pero si la empresa se dedica al estudio y detección de diferentes tipos de plaguicidas, deberá disponer de ambos tipos de instrumentación, pues ambos son complementarios: GC-MS para compuestos volátiles o no polares, LC-MS para sustancias no volátiles, termolábiles y/o polares.

6.- CONCLUSIONES.

Con el presente trabajo, *“Análisis de pesticidas en muestras de alimentos: Tratamiento de la muestra y determinación por LC y GC acopladas a MS”*, se ha pretendido dar una visión general sobre el proceso analítico de determinación de pesticidas en diversas muestras alimentarias.

Para ello, se han descrito en primer lugar las familias de plaguicidas más empleadas en la actualidad en los diferentes ámbitos de la producción de alimentos. Tras ello, se han explicado y ejemplificado las metodologías utilizadas para el tratamiento de las muestras en estudio, detallando los pasos de separación, purificación y concentración de los pesticidas. Por último, se ha hecho hincapié en la detección de los pesticidas mediante GC-MS y LC-MS, que son las técnicas instrumentales más empleadas a día de hoy.

Como se ha podido observar, el uso de las diferentes técnicas de separación de los plaguicidas en muestras alimentarias dependerá de las propiedades físico-químicas de los compuestos a analizar, así como del presupuesto del laboratorio de análisis y las especificaciones requeridas. Tras la separación de los plaguicidas se procede a realizar su determinación, para lo cual el acoplamiento de las técnicas cromatográficas con la espectrometría de masas proporciona indiscutiblemente una mayor cantidad de información analítica en muestras cada vez más complejas a nivel de trazas.

Es importante resaltar además que los nuevos avances de los últimos años en este campo de la química ha permitido alcanzar una mayor selectividad y sensibilidad en todo el proceso analítico, imprescindibles para mejorar la calidad alimentaria y garantizar una adecuada salud pública.

7.- BIBLIOGRAFÍA.

- Adou, K.; Bontoyan, W. R.; Sweeney, P. J. Multiresidue method for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables by accelerated solvent extraction and capillary gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*(9), 4153-60.
- Agilent Technologies. Guía de selección de columnas Agilent J&W para GC. <https://www.agilent.com/cs/library/selectionguide/Public/5990-5488ES.pdf> (Acceso 22 Julio **2018**).
- Al-Alam, J.; Fajloun, Z.; Chvani, A.; Millet, M. A multiresidue method for the analysis of 90 pesticides, 16 PAHs, and 22 PCBs in honey using QuEChERS-SPME. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*(21), 5157-5169.
- Albero Romano, M. B. Determinación de residuos de contaminantes orgánicos en miel y zumos. *Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Químicas, UCM.* **2008**.
- Amendola, G.; Pelosi, P.; Dommarco, R. Solid-phase extraction for multi-residue analysis of pesticides in honey. *J. Environ. Sci. Health B.* **2011**, *46*(1), 24-34.
- Anadón Navarro, A. R. Neurotoxicidad de insecticidas piretroides. Evaluación del riesgo. *Real Academia de Doctores de España.* ISBN: 13 978-84-608-2005-5. **2015**.
- Análisis Vínicos: Extracción en fase sólida. <http://www.analisisvinicos.com/extrafasesolida.php.htm> (Acceso 19 Julio **2017**).
- Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*(2), 412-31.
- Ares, A. M.; Valverde, S.; Bernal, J. L.; Toribio, L.; Nozal, M. J.; Bernal, J. Determination of flubendiamide in honey at trace levels by using solid phase extraction and liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Chem.* **2017**, *232*, 169-176.
- Argauer, R. J.; Eller, K. I.; Ibrahim, M. A.; Brown, R. T. Determining propoxur and other carbamates in meat using HPLC fluorescence and gas chromatography/ion trap mass spectrometry after supercritical fluid extraction. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*(10), 2774-2778.
- Arnnok, P.; Patdhanagul, N.; Burakham, R. Dispersive solid-phase extraction using polianiline-modified zeolite NaY as a new sorbent for multiresidue analysis of pesticides in food and environmental samples. *Talanta.* **2017**, *164*, 651-641.

- Arrieta Víquez, K. M. Validación de la metodología de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas/masas empleando extracción con acetronitrilo y partición con sulfato de magnesio para la determinación de residuos de plaguicidas en frutas y vegetales. *Tesis Doctoral, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica*. **2016**.
- Atienza, J.; Jiménez, J. J.; Bernal, J. L.; Martín, M. T. Supercritical fluid extraction of fluvalinate residues in honey - Determination by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. **1993**, 665(1), 95-9.
- ATSDR (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades): Piretrinas y piretroides. https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts155.html (Acceso 30 Agosto **2017**).
- Ávalos García, A.; Pérez-Urria Carril, E. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. **2009**, 2(3), 119-145.
- Ayazi, Z.; Jaafarzadeh, R.; Matin, A. A. Montmorillonite/polyalinile/polyamide nanocomposite as a novel stir bar coating for sorptive extraction of organophosphorous pesticides in fruit juices and vegetables applying response surface methodology. *Analytical methods*. **2017**, 9(1), 4547-4557.
- Bagheri, H.; Yamini, Y.; Safari, M.; Asiabi, H.; Karimi, M.; Heydari, A. Simultaneous determination of pyrethroids residues in fruit and vegetable samples via supercritical fluid extraction coupled with magnetic solid phase extraction followed by HPLC-UV. *J. Superc. Fluids*. **2016**, 107, 571-580.
- Banerjee, K.; Oulkar, D. S.; Dasgupta, S.; Patil, S. B.; Patil, S. H.; Savant, R.; Adsule, P. G. Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. **2008**, 1173(1-2), 98-109.
- Barco, I. M. H.; Dallos, J. A. G. Qualitative screening method for pesticide residues detection in fruits and vegetables. *Revista colombiana de Química*. **2018**, 47(1), 16-26.
- Barriada-Pereira, M.; González-Castro, M. J.; Muniategui-Lorenzo, S.; López-Mahía, P.; Prada-Rodríguez, D.; Fernández-Fernández, E. Determination of organochlorine pesticides in horticultural samples by microwave assisted extraction followed by GC-ECD. *Int. J. Environ. An. Ch.* **2005**, 85(4-5), 325-333.
- Bartual Sánchez, J.; Berenguer Subils, M. J. NTP 143: Pesticidas: clasificación y riesgos principales. *INSHT*. **1984**.
- Beltrán, J.; López, F. J.; Hernández, P. Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. *J. Chromatogr. A*. **2000**, 885(1-2), 389-404.

- Berrada, H.; Font, G.; Molto, J. C. Application of solid-phase microextraction for determining phenylurea herbicides and their homologous anilines from vegetables. *J. Chromatogr. A.* **2004**, *1042(1-2)*, 9-14.
- Bicchi, C.; Cordero, C.; Lori, C.; Rubiolo, P.; Sandra, P.; Yariwake, J. H.; Zuin, V. G. SBSE-GC-ECD/FPD in the analysis of pesticide residues in Passiflora alata Dryander herbal teas. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51(1)*, 27-33.
- Blasco, C.; Fernández, M.; Picó, Y.; Font, G. Comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction for the determining six organophosphorus insecticides in honey by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2004**, *1030(1-2)*, 77-85.
- Blasco, C.; Font, G.; Picó, Y. Evaluation of 10 pesticide residues in oranges and tangerines from Valencia (Spain). *Food Control.* **2006**, *17(11)*, 841-846.
- Blasco, C.; Vázquez-Roig, P.; Onghena, M.; Masia, A.; Picó, Y. Analysis of insecticides in honey by liquid chromatography-ion-trap-mass spectrometry: Comparison of different extraction procedures. *J. Chromatography A.* **2011**, *1218(30)*, 4892-4901.
- Bogialli, S.; Curini, R.; Di Corcia, A.; Nazzari, M.; Tamburro, D. A simple and rapid assay for analyzing residues of carbamate insecticides in vegetables and fruits : hot water extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52(4)*, 665-71.
- Bolles, H. G.; Dixon-White, H. E.; Peterson, R. K.; Tomerlin, J. R.; Day Jr, E. W.; Oliver, G. R. U.S. market basket study to determine residues of the insecticide chlorpyrifos. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47(5)*, 1817-22.
- Botero Coy, A. M. Aplicaciones de LC-MS/MS en la determinación de residuos de plaguicidas y drogas de abuso en muestras de Latinoamérica. Énfasis en la problemática analítica del glifosato. *Tesis Doctoral, Universidad Jaume I.* **2016**.
- Botero-Coy, A. M.; Marín, J. M.; Serrano, R.; Sancho, J. V.; Hernández, F. Exploring matrix effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of pesticide residues in tropical fruits. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407(13)*, 3667-3681.
- Bouaid, A.; Martín Esteban, A.; Fernández, P.; Cámara, C. Microwave assisted extraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in oranges by gas chromatography (GC). *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *367(3)*, 291-4.
- BVSDE (Biblioteca Virtual de Desarrollo Sostenible y Salud Ambiental). <http://www.bvsde.paho.org/tutorial2/e/unidad3/index.html> (Acceso 3 Septiembre **2017**).

- Caballo-López, A.; de Castro, M. D. L. Continuous ultrasound-assisted extraction coupled to on line filtration-solid-phase extraction-column liquid chromatography-post column derivatisation-fluorescence detection for the determination of N-methylcarbamates in soil and food. *J. Chromatogr. A.* **2003**, *998*(1-2), 51-59.
- Cai, L.; She, W.; Wang, Z.; Zhang, R.; Ding, T.; Yu, K.; Wang, H.; Zhang, W.; Gong, Y. Determination of three organotin pesticide residues in apples and cabbages by gas chromatography-electron impact/positive chemical ionization mass spectrometry. *Chinese J. of Chromatography.* **2017**, *35*(11), 1177-1183.
- Cajka, T.; Hajlova, J.; Lacina, O.; Mastovska, K.; Lehotay, S. J. Rapid analysis of multiple pesticide residues in fruit-based baby food using programmed temperature vaporiser injection-low-pressure gas chromatography-high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2008**, *1186*(1-2), 281-294.
- Calva, L. G.; Torres, M. R. Plaguicidas organoclorados. *ContactoS.* **1998**, *30*, 35-46.
- Cámara, C.; Fernández P.; Martín-Esteban, A.; Pérez-Conde, C.; Vidal, M. Toma y tratamiento de muestras. *Ed. Síntesis*. ISBN: 9788477389620. **2002**.
- Campillo, N.; Peñalver, R.; Aguinaga, N.; Hernández-Córdoba, M. Solid-phase microextraction and gas chromatography with atomic emission detection for multiresidue determination of pesticides in honey. *Anal. Chim. Acta.* **2006**, *562*(1), 9-15.
- Cao, X.; Pang, G.; Jin, L.; Kang, J.; Hu, X.; Chang, Q.; Wang, M.; Fan, C. Comparison of the performances of gas chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry in rapid screening and confirmation of 208 pesticide residues in fruits and vegetables. *Chinese J. Chromatogr.* **2015**, *33*(4), 389-96.
- Carburos Metálicos: Aplicaciones para laboratorios de analítica GC-FPD. <http://www.carburos.com/industries/Analytical-Laboratories/analytical-lab-applications/product-list/gc-with-flame-photometric-detector-gc-fpd-analytical-laboratories.aspx?itemId=5E12372B85BB4009A5425A215D56C92A> (Acceso 3 septiembre **2017**).
- CBM Severo Ochoa. Espectrometría de masas de tipo electrospray (ES/MS). http://www.cbm.uam.es/joomla-rl/images/Servicios/080.Proteomica/documentos/Espectrometria_de_masas_ESI-MSMS_enero_2015.pdf (Acceso 25 Julio **2018**).
- Celeiro, M.; Llompert, M.; Lamas, J. P.; Lores, M.; García-Jares, C.; Dagnac, T. Determination of fungicides in white grape bagasse by pressurized liquid extraction and gas chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2014**, *1343*, 18-25.

- Cherta, L.; Beltrán, J.; Pitarch, E.; Hernández, F. Comparison of Simple and Rapid Extraction Procedures for the Determination of Pesticide Residues in Fruit Juices by Fast Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*. **2013**, 6(6), 1671-1684.
- Choi, M.; Lee, I. S.; Jung, R. H. Rapid determination of organochlorine pesticides in fish using selective pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem*. **2016**, 205, 1-8.
- Convenio de Estocolmo. <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/tabid/673/Default.aspx> (Acceso 5 Septiembre **2017**).
- Convenio de Rotterdam. *FAO y PNUMA*. Revisión **2013**.
- CORDIS. Seguimiento en el tiempo de la concentración de herbicidas en el suelo. https://cordis.europa.eu/result/rcn/85087_es.html (Acceso 22 Agosto **2018**).
- Crecente Otero, P.; Torres Triana, J. L.; Macías Casanova, R.; Sánchez Rodríguez, L. M. Intoxicación por superwarfarinas. *Galicia Clin*. **2012**, 73(3), 121-122.
- CSIC. Espectrometría de masas. http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf (Acceso 10 Julio **2018**).
- CSIC. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia. http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf (Acceso 1 Agosto **2018**).
- D'Amico Sistemas S.A. WATERS: Espectrometría de masas. **2013**. [file:///C:/Users/DA/Desktop/27JulioTFM/ApartadosTFM/Articulos/2018/DAmico Sistemas LCMSMS.pdf](file:///C:/Users/DA/Desktop/27JulioTFM/ApartadosTFM/Articulos/2018/DAmico%20Sistemas%20LCMSMS.pdf) (Acceso 18 Julio 2018).
- Dagher, S. M.; Hawi, Z. K.; Kwar, N. S. Comparison of gas chromatography and immunoassay methods in quantifying fenitrothion residues in grape juice processed into alcoholic drinks. *J. Environ. Sci. Health B*. **1999**, 34(5), 849-58.
- Diagne, R. G.; Foster, G. D.; Khan, S. U. Comparison of Soxhlet and microwave-assisted extractions for the determination of fenitrothion residues in beans. *J. Agric. Food Chem*. **2002**, 50(11), 3204-07.
- DOUE (Diario Oficial de la Unión Europea): Pregunta escrita P-0111/04. **2004**, 2004/C84E/0613.
- Du, J.; Lu, B.; Zhu, P.; Miao, H.; Wu, Y. Determination of 30 organochlorine pesticides in animal-originated food products using combined purification by gel permeation chromatography and solid-phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Chinese J. Chromatography*. **2013**, 31(8), 739-46.

- Educación en Ingeniería Química: Procesos de separación y el desarrollo en la industria de Perú. <http://www.ssecoconsulting.com/procesos-de-separacioacuten--separacioacuten-de-procesos-y-el-desarrollo-de-la-industria-en-el-peruacute.html> (Acceso 17 Julio **2017**).
- Egea Mellado, J. M. Curso "On line" de cribado neonatal. Módulo 1, tema2. 1ª Edición, SEQC. <http://www.seqc.es/download/tema/6/2963/932076606/998102/cms/tema-02-fundamento-de-la-espectrometria-de-masas-en-tandem.pdf/> (Acceso 25 Julio **2018**).
- Fang, Y.; Tian, W.; Pei, F.; Li, P.; Shao, X. L.; Fan, Y.; Hu, Q. H. Simultaneous determination of pesticide residues and antioxidants in blended oil using a liquid-liquid extraction combined with dispersive solid phase extraction method. *Food Chem.* **2017**, *229*, 347-353.
- Fenoll, J.; Hellín, P.; Martínez, C. M.; Flores, P. Multiresidue Analysis of Pesticides in Vegetables and Citrus Fruits by LC-MS-MS. *Chromatographia.* **2010**, *72(9-10)*, 857-866.
- Fernández, F.; Portoles, T.; Pitarch, E.; López, F. J. Target and nontarget screening of organic micropollutants in water by solid-phase microextraction combined with gas chromatography/high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chemistry.* **2007**, *79(24)*, 9494-9504.
- Fernández López, J. A. Introducción a la HPLC. http://www.upct.es/~minaeees/fundamentos_analisis_cromatografico.pdf (Acceso 17 agosto **2018**).
- Ferrer, I.; García-Reyes, J. F.; Mezcuca, M.; Thurman, E. M.; Fernández-Alba, A. R. Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2005**, *1082(1)*, 81-90.
- Fiddler, W.; Pensabene, J. W.; Gates, R. A.; Donoghue, D. J. Supercritical fluid extraction of organochlorine pesticides in eggs. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47(1)*, 206-11.
- Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J. L.; Cruz Sicilia, A. D.; González Rodríguez, M. J.; Plaza Bolaños, P. Multiresidue analysis of organochlorine and organophosphorus pesticides in muscle of chicken, pork and lamb by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* **2006**, *558(1,2)*, 42-52.
- Gilbert-López, B.; García-Reyes, J. F.; Molina-Díaz, A. Determination of fungicide residues in baby food by liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Food Chem.* Nov. **2012**, *135(2)*, 780-786.
- Gilbert-López, B.; Jaén-Martos, L.; García-Reyes, J. F.; Villar-Pulido, M.; Polgar, L.; Ramos-Martos, N.; Molina-Díaz, A. Study on the occurrence of pesticide residues in fruit-based soft drinks from the EU market and morocco using liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Control. Ag.* **2012**, *26(2)*, 341-346.

- Giordano, A.; Fernández-Franzom, M.; Ruiz, M. J.; Font, G.; Pico, Y. Pesticide residue determination in surface waters by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 393(6-7), 1733-1743.
- Gutiérrez, M. C.; Droguet, M. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes del mal olor. *Boletín Intexter (U.P.C.)*. **2002**, 122, 35-41.
- Hamed, A. M.; Moreno-González, D.; Gámiz-Gracia, L.; García-Campaña, A. M. Evaluation of a new modified QuEChERS methods for the monitoring of carbamate residues in high-fat cheeses by using UHPLC-MS/MS. *J. Separat. Sci.* **2017**, 40(2), 488-496.
- Hamke, E.; Lozano, A.; Ucles, S.; Fernández-Alba, A. R. Further improvements in pesticide residue analysis in food by applying gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry (GC-QqQ-MS/MS) technologies. *Anal. And Bioanal. Chemistry.* **2017**.
- Han, Y.; Song, L.; Liu, S.; Zon, N.; Li, Y.; Qin, Y.; Li, X.; Pan, C. Simultaneous determination of 124 pesticide residues of Chinese liquor and liquid-making raw materials (sorghum and rice hull) by rapid Multi-plug Filtration Cleanup and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry.* **2018**, 241, 258-267.
- Hercegova, A.; Domotorova, M.; Matisova, E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. *J. Chromatogr. A.* **2007**, 1153(1-2), 54-73.
- Hortoinfo. El consumo mundial de pesticidas supera los 3000 millones de kilos, 0,62 kilos por hectárea (2017). <http://www.hortoinfo.es/index.php/5854-cons-mund-pest-120717> (Acceso 24 agosto **2018**)
- Ingeniería Analítica. Cromatografía Líquida (HPLC-MS/MS). <http://www.ingenieria-analitica.com/analisis-cuali-cuanti-por-hplc-ms-ms.html> (Acceso 2 Agosto **2018**).
- Jiménez, J. J.; Bernal, J. L.; del Nozal, M. J.; Martín, M. T.; Mayorga, A. L. Solid-phase microextraction applied to the analysis of pesticide residues in honey using gas chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatogr. A.* **1998**, 829(1-2), 269-77.
- Kaczynski, P. Clean-up and matrix effect in LC-MS/MS analysis of food of plant origin for high polar herbicides. *Food Chem.* **2017**, 230, 524-531.
- Kaczynski, P. Large-scale multi-class herbicides analysis in oilseeds by rapid one-step QuEChERS-based extraction and cleanup method using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2017**, 230, 411-422.

- Kaihara, A.; Yoshii, K.; Tsumura, Y.; Nakamura, Y.; Ishimitsu, S.; Tonogai, Y. Multiresidue analysis of pesticides in fresh fruits and vegetables by supercritical fluid extraction and HPLC. *J. Health Sci.* **2000**, *46*(5), 336-342.
- Kawaguchi, M.; Ito, R.; Saito, K.; Nakazawa, H. Novel stir bar sorptive extraction methods for environmental and biomedical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *40*(3), 500-508.
- Khan, S.; Bhatia, T.; Trivedi, P. Satyanarayana, G. N. V.; Mandrah, K.; Saxena, P. N.; Mudiam, M. K. R.; Roy, S. K. Selective solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer as a sorbent for the analysis of fenarimol in food samples. *Food Chem.* **2016**, *199*, 870-875.
- Khan, Z.; Kamble, N.; Bhongale, A.; Girme, M.; Chauhan, V. B.; Banerjee, K. Analysis of pesticide residues in tuber crops using pressurised liquid extraction and chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry.* **2018**, *241*, 250-257.
- Koksál, Z.; Kalin, R.; Gulcin, I.; Ozdemir, H.; Atasever, A. Impact of some avermectins on lactoperoxidase in bobine milk. *Int. J. Food Prop.* **2016**, *19*(6), 1207-1216.
- Lambropoulou, D. A.; Albanis, T. A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*(6), 1663-83.
- Lazic, S.; Sunjka, D.; Jovanov, P.; Vukovic, S.; Guzsvany, V. LC-MS/MS determination of acetamiprid residues in sweet cherries. *Romanian Biotech. Letters.* **2018**, *23*(1), 13317-26.
- Lee, J.; Kim, L.; Shin, Y.; Lee, J.; Lee, J.; Kim, E.; Moon, J. K.; Kim, J. H. Rapid and simultaneous analysis of 360 pesticides in brown rice, spinach, orange, and potato using microbore GC-MS/MS. *J. Agricultural and Food Chemistry.* **2017**, *65*(16), 3388-3396.
- Lehotay, S. J.; Eller, K. Development of a method of analysis for 46 pesticides in fruits and vegetables by supercritical fluid extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *J. AOAC Int.* **1995**, *78*(3), 821-30.
- LENNTECH: La biblioteca de Preguntas relacionadas con el agua. <http://www.lennotech.es/faq-contaminantes-del-agua.htm> (Acceso 17 agosto **2017**).
- Li, D. Q.; Zhang, X.; Kong, F. F. ; Qiao, X. G. ; Xu, Z. X. Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction coupled with High-Performance Liquid Chromatography for the determination of trace trichlorfon and monocrotophos residues in fruits. *Food Anal. Methods.* **2017**, *10*(5), 1284-1292.

- Li, Y. B.; Tang, H. X.; Black, K. C.; Dong, M. F.; Wang, W. M.; Song, W. G. Determination of fluazinam in vegetables and fruits using a modified QuEChERS method and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food. Anal. Meth.* **2017**, *10(6)*, 1881-1887.
- Liu, X.; Abd El-Aty, A. M.; Park, J, Park, J.; Cho, S.; Shin, H.; Shim, J. Determination of spinetoram in leafy vegetable crops using liquid chromatography and confirmation via tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography.* **2011**, *25(10)*, 1099-1106.
- Macías Cabrera, B. E.; Aranda Tafolla, O. Extracción de piretrinas para uso insecticida. <http://www.acmor.org.mx/sites/default/files/piretrinas.pdf> (Acceso 10 julio **2017**).
- Makabe, Y.; Miyamoto, F.; Hashimoto, H.; Nakanishi, K.; Hasegawa, Y. Determination of Residual Pesticides in Processed Foods Manufactured from Livestock Foods and Seafoods Using Ion Trap GC/MS. *Food Hygiene and Safety Science.* **2010**, *51(4)*, 182-195.
- Malhat, F.; Boulange, J.; Abdelraheem, E.; Abd Allah, O.; Abd El-Hamid, R.; Abd El-Salam, S. Validation of QuEChERS based method for determination of fenitrothion residues in tomatoes by gas chromatography-flame photometric detector: Decline pattern and risk assessment. *Food Chem.* **2017**, *229*, 814-819.
- Marín López, L. F.; Jaramillo Colorado, B. Aislamiento de bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados encontrados en suelos y en leche bobina. *Rev. Chil. Nut.* **2015**, *42(2)*, 179-185.
- Martín Gómez, M. C.; Ballesteros González, M. 4. Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. Universidad Complutense de Madrid. <https://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1066/1063> (Acceso 25 agosto **2018**).
- Martínez, A. Breve Enciclopedia del Ambiente: Organofosforados. <http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Organofosf.htm> (Acceso 25 Agosto **2017**).
- Martínez Vidal, J. L.; Plaza-Bolaños, P.; Romero-González, R.; Garrido Frenich, A. Determination of pesticide transformation products: A review of extraction and detection methods. *J. Chromatogr. A.* **2009**, *1216(40)*, 6767-6788.
- Martins, M. L.; Donato, F. F.; Prestes, O. D.; Adaime, M. B.; Zanella, R. Determination of pesticide residues and related compounds in water and industrial effluent by solid-phase extraction and gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405(24)*, 7697-7709.
- Meghesan-Breja, A.; Cimpoiu, C.; Hosu, A. Multiresidue analysis of pesticides and metabolites from fruits and vegetables by gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Acta Chromatographica.* **2015**, *27(4)*, 657-685.

- Meghesan-Breja, A.; Cimpoi, C.; Hosu, A. Identification and Quantification of some pesticide metabolites from vegetables by GC-TOF-MS and LC-MS-QQQ. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Chemia*. **2017**, 62(3), 19-34.
- Menkissoglu-Spiroudi, U.; Diamantidis, G. C.; Georgiou, V. E.; Thrasyvoulou, A. T. Determination of malathion, coumaphos, and fluvinate residues in honey by gas chromatography with nitrogen-phosphorus or electron capture detectors. *J. AOAC Int.* **2000**, 83(1), 178-82.
- Mestanza Mateos, M. Estudio de materiales adsorbentes para el tratamiento de aguas contaminadas con colorantes. *Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Químicas, UCM*. **2012**.
- Nácher Mestre, J. Potencial de acoplamiento GC-MS para la determinación de contaminantes orgánicos en muestras de matriz compleja. *Tesis Doctoral, Universidad Jaume I*. **2011**.
- Navarro, M.; Picó, Y.; Marín, R.; Mañes, J. Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of a new generation of fungicides in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A*. **2002**, 968(1-2), 201-9.
- Nguyen, T. D.; Yu, J. E.; Lee, D. M.; Lee, G. H. A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS sample preparation method and gas chromatography mass spectrometry. *Food Chem.* **2008**, 110(1), 207-213.
- Nollet, M. L.; Toldrá, F. Sensory analysis of foods of animal origin. *Ed. CRC Press*. ISBN: 13-978-1-4398-4796-1. **2011**.
- Notardonato, I.; Salimei, E.; Russo, M. V.; Avino, P. Simultaneous determination of organophosphorus pesticides and phthalates in baby food samples by ultrasound-vortex-assisted liquid-liquid microextraction and GC-IT/MS. *Anal. Bioanal. Chemistry*. **2018**, 410(14), 3285-3296.
- Obiols Quinto, J. NTP 512: Plaguicidas organofosforados (I): aspectos generales y toxicocinética. *INHST*. **1999**.
- Pang, G.; Cao, Y.; Zhang, J.; Fan, C.; Liu, Y.; Li, X.; Jia, G.; Li, Z.; Shi, Y.; Wu, Y.; Guo, T. Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography cleanup/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatography A*. **2006**, 1125(1), 1-30.
- Papadakis, E. N.; Kyrgidou, A.; Vryzas, A.; Papadopoulou-Mourkidou, E. Development of a microwave-assisted extraction method for the determination of organochlorine pesticides in mussel tissue. *Food Anal. Meth.* **2014**, 7(6), 1271-1277.

- Papadakis, E. N.; Vryzas, Z.; Papadopoulou-Mourkidou, E. Rapid method for the determination of 16 organochlorine pesticides in sesame seeds by microwave-assisted extraction and analysis of extracts by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. S.* **2006**, *1127(1-2)*, 6-11.
- Pareja, L.; Fernández-Alba, A. R.; Cesio, V.; Heinzen, H. Analytical methods for pesticide residues in rice. *TrAC Trends in Anal. Chem.* **2011**, *30(2)*, 270-291.
- Pastene Maldonado, D. O. Cuantificación absoluta de angiotensina II por dilución isotópica y espectrometría de masas en tandem. Trabajo Fin de Máster, Oviedo, Enero **2016**.
- Pérez-Ortega, P.; Gilbert-López, B.; García-Reyes, J. F.; Ramos-Martos, N.; Molina-Díaz, A. Generic sample treatment method for simultaneous determination of multiclass pesticides and mycotoxins in wines by liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2012**, *1249*, 32-40.
- Portoles, T.; Ibáñez, M.; Garlito, B.; Nacher-Mestre, J.; Karalazos, V.; Silva, J.; Alm, M.; Serrano, R.; Pérez-Sánchez, J.; Hernández, F.; Berntssen, M. H. G. Comprehensive strategy for pesticide residue analysis through the production cycle of gilthead sea bream and Atlantic salmon. *Chemosphere.* **2017**, *179*, 242-253.
- Qin, X.; Zhao, L.; Huang, Q.; Liu, Y.; Xu, Y.; Qin, D.; Liu, Y. Rapid Multi-Residue Determination of Pesticides in Animal-Derived Food via Modified QuEChERS Sample Preparation and GC/MS. *Food Anal. Methods.* **2018**, *11(5)*, 1493-1500.
- Qu, L.; Li, Y.; Zeng, J.; Sheng, Y.; Yi, X.; Cheng, J. Determination of 20 pyrethroid residues in vegetable foods by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese J. of Chromatography.* **2017**, *35(7)*, 778-784.
- Qu, L.; Zhang, H.; Zhu, J.; Yang, G.; Aboul-Enein, H. Rapid determination of organophosphorous pesticides in leeks by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry.* **2010**, *122(1)*, 327-332.
- Qu, Z. P.; Bai, X. Z.; Zhang, T.; Yang, Z. G. Ultrasound-assisted extraction and solid-phase extraction for the simultaneous determination of five amide herbicides in fish samples by gas chromatography with electron capture detection. *J. Separat. Sci.* **2017**, *40(5)*, 1142-1149.
- Ramírez Milla, L. G. Determinación de pesticidas en vegetales mediante cromatografía de gases-espectrometría de masa/masa (GC-MS/MS). Tesis, Universidad Tecnológica de la Mixteca, México. Noviembre **2009**.
- Ramírez-Muñoz, F. Paraquat: por qué es necesaria su prohibición. *Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas, Univ. Nac. de Costa Rica, RAPAL.* **2007**.

- Rejczak, T.; Tuzimski, T. QuEChERS-based extraction with dispersive solid phase extraction clean-up using PSA and ZrO₂-based sorbents for determination of pesticides in bovine milk samples by HPLC-DAD. *Food Chem.* **2017**, *217*, 225-233.
- Rezic, I.; Horvat, A. J. M.; Babic, S.; Kastelan-Macan, M. Determination of pesticides in honey by ultrasonic solvent extraction and thin-layer chromatography. *Ultrason. Sonochem.* **2005**, *12(6)*, 447-481.
- Rial-Otero, R.; Gaspar, E. M.; Moura, I.; Capelo, J. L. Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview. *Talanta.* **2007**, *71(2)*, 503-14.
- Richter, B. E.; Hoeffler, F.; Linkerhaegner, M. Determining organophosphorus pesticides in foods using accelerated solvent extraction with large sample sizes. *LC-GC.* **2001**, *19(4)*, 408-13.
- Rissato, S. R.; Galhiane, M. S.; Gerenutti, M. Multiresidue method for determination of pesticides in fruits using supercritical fluid extraction. *Inform. Tecn.* **2005**, *16(6)*, 13-19.
- Rodríguez, J. Seminario de Espectrometría de masas para usuarios del SUIC. http://www.um.es/documents/1765772/1843567/sic_seminario_em_usuarios_2010.pdf/a7b695e4-2594-4f32-8150-fe8ffbe98ee1 (Acceso 28 Julio **2018**).
- Rodríguez-Cabo, T.; Casado, J.; Rodríguez, I.; Ramil, M.; Cela, R. Selective extraction and determination of neonicotinoid insecticides in wine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2016**, *1460*, 9-15.
- Rodríguez Fernández-Alba, A.; Agüera López, A. Evaluación y seguimiento de plaguicidas en aguas subterráneas y superficiales. Universidad de Almería, Servicio de Publicaciones. **2002**, 181-203.
- Rojas, F.; Ríos, Y. Intercambio iónico. <https://es.slideshare.net/rosaynhe/intercambio-ionico-39204309> (Acceso 17 Agosto **2017**).
- Roldán Tapia, M. D. Secuencias neuropsicológicas por intoxicación aguda o exposición crónica a plaguicidas inhibidores de las colinesterasas. Tesis Doctoral, Universidad de Almería. **2000**.
- Romero-González, R.; Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J. L. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta.* **2008**, *76(1)*, 211-225.
- Routt Reigart, J.; Roberts, J. R. Reconocimiento y manejo de los envenenamientos por plaguicidas. *5ª ed.* **1999**.

- Ruiz-Hitzky, E.; Leguey, S.; Álvarez, A. Sepiolita: materia prima y materiales avanzados. *Análisis madri+d*. **2007**. <http://www.madrimasd.org/informacionidi/analisis/analisis/analisis.asp?id=30064> (Acceso 4 septiembre 2017).
- Salamzadeh, J.; Shakoori, A.; Moradi, V. Occurrence of multiclass pesticide residues in tomato samples collected from different markets of Iran. *J. Env. Health Science & Engineering*. **2018**, *16(1)*, 55-63.
- Sánchez Martín, M. J.; Sánchez Camazano, M. Los plaguicidas: adsorción y evolución en el suelo. *Ed. CeresNet. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología*. **1984**, 1ª edición.
- Sánchez-Ortega, A.; Unceta, N.; Gómez-Caballero, A.; Sampedro, M. C.; Akesolo, U.; Goicolea, M. A.; Barrio, R. J. Sensitive determination of triazines in underground waters using stir bar sorptive extraction directly coupled to automated thermal desorption and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*. **2009**, *641(1-2)*, 110-116.
- Sandra, P.; Tienpont, B.; David, F. Multi-residue screening of pesticides in vegetables, fruits and baby food by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. **2003**, *1000(1-2)*, 299-309.
- Sandra, P.; Tienpont, B.; Vercammen, J.; Tredoux, A.; Sandra, T.; David, F. Stir bar sorptive extraction applied to the determination of dicarboximide fungicides in wine. *J. Chromatogr. A*. **2001**, *928(1)*, 117-26.
- Santa, J.-R.; Serrano, M.; Stashenko, E. Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de hidrocarburos presentes en aguas residuales industriales. *Cienc. Tecnol. Futuro*. **2002**, *2(3)*, 49-60.
- Sapahin, H. A.; Makahleh, A.; Saad, B. Determination of organophosphorus pesticide residues in vegetables using solid phase micro-extraction couples with gas chromatography-flame photometric detector. *Arab. J. Chem*. **2014**.
- Sarker, M.; Ahmed, I.; Jung, S. H. Adsorptive removal of herbicides from water over nitrogen-doped carbon obtained from ionic liquid@ZIF-8. *Chem. Engin. J*. **2017**, *323*, 203-211.
- Saúl, L. High-Performance Liquid Chromatography vs. Ultra-High Performance Liquid Chromatography. *AZO Materials*. <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=15555> (Acceso 20 agosto **2018**).
- Schenck, F. J.; Wagner, R. Screening procedure for organochlorine and organophosphorus pesticide residues in milk using matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and gas chromatographic determination. *Food Addit. Contam.* **1995**, *12(4)*, 535-41.

- Sector Agropecuario. Insecticidas y acaricidas químicos: tipos e historia. <http://www.sectoragropecuario.com/insecticidas-y-acaricidas-quimicos-tipos-e-historia/> (Acceso 1 septiembre 2017).
- Shakouri, A.; Yazdanpanah, H.; Shojaee, M. H.; Kobarfard, F. Method Development for Simultaneous Determination of 41 Pesticides in Rice Using LC-MS/MS Technique and Its Application for the Analysis of 60 Rice Samples Collected from Tehran Market. *Iranian J. of Pharmaceutical Research*. **2014**, 13(3), 927-935.
- Simplicio, A. L.; Boas, L. V. Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. *J. Chromatogr. A*. **1999**, 833(1-2), 35-42.
- Singh, A.; Nag, S. K.; Singh, S. Persistent organochlorine pesticide residue in tissue and blood of goat. *J. App. Animal Research*. **2015**, 43(3), 366-371.
- Singh, S. B.; Foster, G. D.; Khan, S. U. Microwaved-assisted extraction for the simultaneous determination of thiamethoxam, imidacloprid, and carbendazim residues in fresh and cooked vegetable samples. *J. Agric. Food. Chem.* **2004**, 52(1), 105-9.
- Singh, S. B.; Foster, G. D.; Khan, S. U. Determination of thiophanate methyl and carbendazim residues in vegetable samples using microwave-assisted extraction. *J. Chromatogr. A*. **2007**, 1148(2), 152-7.
- Sivaperumal, P.; Anand, P.; Riddhi, L. Rapid determination of pesticide residues in fruits and vegetables, using ultra-high-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Food Chemistry*. **2015**, 168, 356-365.
- Sivaperumal, P.; Salauddin, A.; Kumar, A. R.; Santhosh, K.; Rupal, T. Determination of pesticide residues in mango matrices by Ultra High-Performance Liquid Chromatography coupled Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Food Anal. Methods*. **2017**, 10(7), 2346-2357.
- Stajnbaher, D.; Zupancic-Kralj, L. Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. **2003**, 1015(1-2), 185-198.
- Stashenko, E. E.; Martínez, J. R. GC-MS: Más de un Analizador de Masas, ¿para qué?. *Sci. Chromatographica*. **2010**, 2(4), 25-48.
- StudiLib: Cromatografía de afinidad. <http://studylib.es/doc/6099970/cromatograf%C3%ADa-de-afinidad> (Acceso 23 Agosto 2017).

- Suárez-Jacobo, A.; Alcantar-Rosales, V. M.; Alonso-Segura, D.; Heras-Ramírez, M.; Elizarragaz-De La Rosa, D.; Lugo-Melchor, O.; Gaspar-Ramírez, O. Pesticide residues in orange fruit from citrus orchards in Nuevo Leon State, Mexico. *Food Addit. Contam. B.* **2017**, *10(3)*, 192-199.
- Suministros Industriales Valladolid. Noticias: La sepiolita y sus usos en el sector industrial. <http://www.suministrosvalladolid.com/noticias-la-sepiolita-y-sus-usos-en-el-sector-industrial.10.html> (Acceso 30 Agosto **2017**).
- Tadeo, J. L.; Sánchez-Brunete, C.; Albero, B.; González, L. Analysis of pesticide residues in juice and beverages. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2004**, *34(3-4)*, 165-175.
- Taha, S. M.; Gadalla, S. A. Development of an efficient method for multi residue analysis of 160 pesticides in herbal plant by ethyl acetate hexane mixture with direct injection to GC-MS/MS. *Talanta.* **2017**, *174*, 767-779.
- Tahboub, Y. R.; Zaater, M. F.; Barri, T. A. Simultaneous identification and quantitation of selected organochlorine pesticide residues in honey by full-scan gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* **2006**, *558*, 62-68.
- Tamayo, F. G.; Casillas, J. L.; Martín-Esteban, A. Clean up of phenylurea herbicides in plant extracts using molecularly imprinted polymers. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381(6)*, 1234-40.
- Tesis Doctorales en Xarxa. Cromatografía de Líquidos – Espectrometría de Masas. <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/2729/4.pdf?sequence=4> (Acceso 28 Julio **2018**).
- Textos Científicos: Los materiales adsorbentes. <https://www.textoscientificos.com/quimica/carbon-activo/materiales-adsorbentes> (Acceso 28 Agosto **2017**).
- Thermo Fisher Scientific. GC-MS Systems. <https://www.thermofisher.com/es/es/home/industrial/mass-spectrometry/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc-ms/gc-ms-systems.html> (Acceso 13 Julio **2018**).
- Thermo Fisher Scientific. LC-MS Systems. <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/TSQ02-10001> (Acceso 2 Agosto **2018**).
- Timofeeva, I.; Shishov, A.; Kanashina, D.; Dzema, D.; Bulatov, A. On-line in-syringe sugaring-out liquid-liquid extraction coupled with HPLC-MS/MS for the determination of pesticides in fruit and berry juices. *Talanta.* **2017**, *167*, 761-767.
- Tuesca, D. Triazinas, ureas y uracilos. http://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portallG/home_4/mod_virtuales/modulo3/4.pdf (Acceso 5 Julio **2017**).

- Tuzimski, T.; Rejczak, T. Application of HPLC-DAD after SPE/QuEChERS with ZrO₂-based sorbent in d-SPE clean-up step for pesticide analysis in edible oils. *Food Chem.* **2016**, *190*, 71-79.
- Universidad de Alicante. Espectrometría de masas de alta resolución. <https://ssti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-espectrometria-de-masas/espectrometria-de-masas-de-alta-resolucion.html> (Acceso 27 Julio **2018**).
- Universidad de Alicante. Tema 5: Espectrometría de masas. <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8249/4/T5masas.pdf> (Acceso 15 Julio **2018**).
- Universidad de Alicante. Tema 4: Cromatografía de líquidos de alta resolución. <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8248/4/T4cromatliquid.pdf> (Acceso 2 agosto **2018**).
- Vademecum: Warfarina. <https://www.vademecum.es/principios-activos-warfarina-b01aa03> (Acceso 2 septiembre **2017**).
- Valverde, A.; Aguilera, A.; Rodríguez, M.; Brotons, M. Evaluation of a multiresidue method for pesticides in cereals using supercritical fluid extraction and gas chromatographic detection. *J. Environ. Sci. Health B.* **2009**, *44*(3), 214-213.
- Vichapong, J.; Santaladchaiyakit, Y.; Burakham, R.; Srijaranai, S. Determination of benzimidazole anthelmintics in eggs by advanced microextraction with High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Letters.* **2015**, *48*(4), 617-631.
- Vilca, F. Z.; Andrade, G. C. R. M.; Cuba, W. A. Z.; Tornisielo, V. L. Determination of pesticides residues in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) using QuEChERS and LC-MS/MS. *Emirates J. Food and Agric.* **2018**, *30*(5), 421-427.
- Wang, J. J.; Gong, Z. G.; Zhang, T. T.; Feng, S.; Wang, J. D.; Zhang, Y. Simultaneous determination of 106 pesticides in nuts by LC-MS/MS using freeze-out combined with dispersive solid-phase extraction purification. *J. Separat. Sci.* **2017**, *40*(11), 2398-2405.
- Waters. Oasis HLB Cartridges and 96-Well Plates: Care and use manual. <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715000109.pdf> (Acceso 22 Julio 2017).
- Weichbrodt, M.; Vetter, W.; Lucas, B. Microwaved-assisted extraction and accelerated solvent extraction with ethyl acetate-cyclohexane before determination of organochlorines in fish tissue by gas chromatography with electron-capture detection. *J. AOAC Int.* **2000**, *83*(6), 1334-43.
- Wennrich, L.; Popp, P.; Koeller, G.; Breuste, J. Determination of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in strawberry by using accelerated solvent extraction combined with

sorptive enrichment and gas chromatography-mass spectrometry. *J. AOAC Int.* **2001**, *84*(4), 1194-201.

- World Health Organization. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009. ISBN: 978 92 4 154796 3. **2010**.
- Yi, X.; Shi, Y.; Zhao, S.; Meng, L.; Pan, X.; Sheng, Y.; Han, L.; Zhu, J.; Deng, X.; Guo, D. Rapid screening of 182 pesticide residues in foods by gas chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Chinese J. of Chromatography.* **2016**, *34*(11), 1097-1105.
- Zhang, H. Y.; Wang, C.; Xu, P. J.; Ma, Y. Q. Analysis of molluscicide metaldehyde in vegetables by dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam. A.* **2011**, *28*(8), 1034-1040.
- Zheng, W. J.; Park, J. A.; Zhang, D.; Abd El-Aty, A. M.; Kim, S. K.; Cho, S. H.; Choi, J. M.; Shim, J. H.; Chang, B. J.; Kim, J. S.; Shin, H. C. Determination of fenobucarb residues in animal and aquatic food products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with a QuEChERS extraction method. *J. Chromatogr. B.* **2017**, *1058*, 1-7.