

Retos analíticos y perspectivas instrumentales del monitoreo de pesticidas

Claudio Jiménez Cartagena*,
Daniel Esteban León Pérez**,
Gustavo Antonio Peñuela Mesa***

Resumen

La complejidad de las matrices ambientales, de las matrices alimenticias, las bajas concentraciones de los xenobióticos, su termodinámica, su persistencia y su metabolismo, alerta con respecto a los resultados analíticos obtenidos a través de las metodologías convencionales. El objetivo nunca será suprimirlas, sino disponer de metodologías comparables para garantizar que los datos reportados reflejen la dinámica real de cada analito en la matriz de interés. El análisis cualitativo y el análisis cuantitativo han permitido el desarrollo de técnicas instrumentales robustas y reproducibles; sin embargo, no solo basta con la dotación instrumental, sino, que el fortalecimiento de las técnicas de muestreo, del tratamiento de muestra y de la interpretación de los resultados, son tópicos fundamentales para los procesos de validación de metodologías de monitoreo y de tamizaje de microcontaminantes orgánicos.

El concepto de residualidad es claro para las comunidades académicas, científicas e incluso para el generador, pero su determinación y cuantificación siempre será un reto académico de gran trascendencia, un soporte legal indispensable y una responsabilidad social del sector productivo para con la salud pública y el mantenimiento del planeta. La responsabilidad de las universidades, de los centros de desarrollo tecnológico y del sector privado es desarrollar de metodologías

* Químico farmacéutico, magíster en Ciencias Básicas Biomédicas Subespecialidad Bioquímica, candidato a doctor en Ingeniería Ambiental. Director Grupo de Investigación Aplicada al Medioambiente (GAMA), Facultad de Ingenierías, Corporación Universitaria Lasallista. Caldas-Antioquia-Colombia. Correspondencia: clajimenez@lasallista.edu.co

** Ingeniero de alimentos, Grupo Diagnóstico y Control de la Contaminación-GDCON, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia. Medellín-Colombia

*** Químico, magíster en Química, doctor en Ingeniería Ambiental. Director Grupo Diagnóstico y Control de la Contaminación-GDCON, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia. Medellín-Colombia

analíticas rápidas y precisas para el monitoreo no solo de contaminantes, sino, de compuestos de interés. El desarrollo de sistemas de tratamiento de muestras junto con los desarrollos cromatográficos y sus complementos con la espectrometría de masas, constituyen un pilar fundamental para la toma de decisiones en el análisis de compuestos o productos de transformación en diferentes matrices en bajos niveles, inclusive, de partes por trillón (ppt).

Cada vez, el monitoreo analítico cobra mayor importancia, está más normalizado y demanda técnicas de seguimiento in situ y en tiempo real. Entre los cuales los biosensores, constituyen una herramienta de gran precisión y exactitud para los sistemas de monitoreo. Por lo anterior, esta revisión pretende mostrar algunos desarrollos en el tratamiento de muestra y en complementos instrumentales para la optimización de los procesos de identificación y cuantificación de contaminantes en matrices ambientales y en matrices alimenticias.

Analytic challenges and instrumental perspectives in pesticides monitoring

Abstract

The complexity of environmental and food matrixes, plus the low levels of xenobiotic agents, their thermodynamics, their persistence and their metabolism are interesting, given the analytic results obtained by conventional methodologies. The objective will never be to eliminate them, but to have similar methodologies in order to guarantee that the data reported show the actual dynamic of each analyte in the interest matrix. Qualitative and quantitative analysis have permitted the development of robust and repeatable instrumental techniques. Nevertheless, instrumental provision is not enough. Strengthening the sampling techniques for treating the samples and interpreting results is a fundamental point for validating the monitoring and organic micro pollutants screening methods. The concept of residuality is clear for academic and scientific communities, and even for the one who generates such pollutants. But determining and counting those pollutants will always be a great academic challenge, an indispensable legal support and a social responsibility for the productive sector with public health and the planet's sustainability. The biggest responsibility for universities, technological development centers and the private sector is to have rapid and accurate analytical technologies to not only monitor pollutants, but compounds of interest. The development in sample treatment systems, along with the development of chromatography and its complementation with mass spectrometry, are a fundamental basis for choice making about determining compounds or transformation products in diffe-

rent matrix levels, including parts per trillion (ppt). Analytical monitoring is becoming more and more important, is more regulated and demands a complementation with on site follow up techniques in real time, such as bio sensors, which are a very precise and exact tool for the monitoring systems. Given all of the facts exposed above, this review aims to show some advances in sampling and instrumental complementary elements to optimize the identification and quantification processes for pollutants in environmental and food matrixes

Introducción

El análisis de residuos de los pesticidas y otros contaminantes en los alimentos involucra la identificación y determinación de sustancias que se encuentran a concentraciones de subtrazas. Tras diseñar un muestreo lo suficientemente representativo, se procede con la etapa de extracción cuantitativa del analito y posteriormente se purifica y/o concentra el extracto obtenido antes de seguir en la etapa instrumental.

Los pesticidas constituyen uno de los contaminantes de mayor presencia en productos alimenticios de origen agrícola, y su presencia en los alimentos puede deberse a exposición a lo largo de la cadena productiva. Las frutas y vegetales son un tipo de alimento de gran demanda y cuyos procesos productivos se han sustentado en el uso de agroquímicos, detectados no solo en los productos en fresco, sino también, en productos procesados. En aras de proteger la salud de los consumidores es necesario garantizar ausencia de residuos o que no supongan un riesgo para los seres humanos y los animales. Los Límites máximos de residuos (MRL) son en el mecanismo para reducir el riesgo de los consumidores ante residuos de pesticida o de alguno de sus metabolitos.

En general, las técnicas convencionales de muestreo se fundamentan en la recolección de la muestra y su posterior almacenamiento hasta el análisis. Se parte de una muestra representativa, entre 2 y 10 L para muestras líquidas y entre 1 y 2 kg para muestras sólidas. Se prosigue con la homogeneización para garantizar que el tamaño muestral sea lo más representativo.

En el caso de una muestra líquida, es necesario filtrar para eliminar el material particulado; éste proceso debe efectuarse con mucho cuidado ya que algunos analitos hidrofóbicos como los organoclorados pueden ser adsorbidos en la superficie de las partículas y, alterando la recuperación y dirigiendo el uso de un método invasivo para la extracción. Por lo general, las muestras de agua sólo requieren de filtración, mientras que las muestras de alimentos líquidos deben ser sometidas a tratamientos previos en función del objetivo del análisis. Sin embargo, las muestras sólidas de origen ambiental y de alimentos deben ser pretratadas para lograr obtener una submuestra homogénea.

Independiente de la dificultad de las etapas analíticas, los desarrollos para dar cumplimiento con los MRL deben arrojar métodos analíticos reproducibles, seguros, rápidos y económicos, que permitan realizar tamizajes con celeridad, con el menor impacto ambiental y que permitan análisis seriados de diferentes muestras para la toma rápida de decisiones dentro de los procesos de inspección y vigilancia de la seguridad alimentaria.

Métodos de extracción

El proceso de extracción constituye la primera etapa de la preparación de la muestra. Su objetivo es separar el analito de la matriz para disminuir las interferencias, lo cual implica un estudio riguroso de las propiedades fisicoquímicas del mismo y las posibles interacciones con los constituyentes de la matriz.

Muestras sólidas

Métodos convencionales

El uso de solventes orgánicos constituye la práctica analítica de mayor aplicación para la extracción de pesticidas de los alimentos, y la extracción líquido-líquido (LLE) constituye el eje central de la mayoría de las determinaciones. Este método se fundamenta en el reparto del analito entre dos líquidos inmiscibles, y la eficiencia del proceso depende de la afinidad del analito por el solvente y del número de extracciones efectuadas. De ser un método sencillo ha pasado a sufrir modificaciones como la utilización de mezclas de solventes, modificaciones en el pH y el uso del efecto salino para la optimización de la extracción.

En el caso de agua y productos alimenticios (zumos y jugos) es necesario hacer una remoción del material particulado mediante filtros de fibra de vidrio previamente muflados para eliminar interferencias por materia orgánica. Por su parte, para el tratamiento de muestras sólidas (frutas y vegetales) es necesario triturar previo a una extracción sólido-líquido para lograr que los analitos sean separados eficientemente. En este caso, la eficiencia del proceso de extracción depende de la solubilidad, de la transferencia de masa y del efecto de la matriz. Ésta puede verse favorecida por el tamaño de partícula, de la temperatura, del coeficiente de difusión, de la agitación, de la presión y de la viscosidad del solvente.

La extracción sólido-líquido depende de la fortaleza de las interacciones entre los analitos y la matriz. La extracción con agitación, la extracción Soxhlet y la extracción asistida por ultrasonido son los procedimientos de extracción sólido-líquido más utilizados para la determinación de pesticidas en alimentos.

La extracción con agitación se lleva a cabo colocando en contacto la muestra con un solvente orgánico y agitando vigorosamente la mezcla para que se produzca la transferencia del analito de la matriz al solvente, con posterior filtración o centrifugación de la solución. El proceso anterior se debe repetir como mínimo dos veces y

al final se combinan los extractos obtenidos. Este método es recomendado cuando la solubilidad del analito en el solvente es alta y la matriz presenta alta porosidad. Para el caso en que los analitos son fuertemente retenidos en la matriz, es necesario utilizar reflujo con temperatura o ultrasonicar para aprovechar la radiación.

La extracción con Soxhlet es el método más utilizado para separar analitos de baja o media volatilidad y estables térmicamente. Pese a su difícil automatización y dificultad para la validación, se sigue como método oficial para muchos compuestos y se le atribuyen bondades como el no requerir posterior filtración y permitir la recuperación del solvente.

Por último, la extracción asistida por ultrasonido se efectúa a temperatura ambiente y por períodos de 10 a 15 minutos. Es aplicable a pesticidas termolábiles; sin embargo, requiere un buen conocimiento de la química del analito, ya que se han reportado procesos de degradación de algunos compuestos.

Los métodos anteriores no requieren de sofisticación, lo que los hace fáciles de utilizar y económicos. Sin embargo, entre las desventajas más importantes están el uso de grandes volúmenes de solvente y la demanda de material de vidrio, cuyo proceso de lavado es costoso e impacta seriamente el ambiente. Adicionalmente, éstos deben ser acompañados de etapas de purificación y de concentración, que llevan a pérdida de los analitos por manipulación.

Extracción con fluidos supercríticos

La extracción con fluidos supercríticos (SFE)¹ es una técnica muy empleada en el sector agroalimentario para la obtención de aromas, de sabores, de bebidas no alcohólicas y de aceites de semillas o productos de origen animal. Las excelentes propiedades ofrecidas por un fluido supercrítico como la selectividad, la alta difusividad y su baja viscosidad han hecho de ésta, una técnica muy amigable y de grandes perspectivas. Se empezó a utilizar a mediados de la década de 1980 cuando se viabilizó la comercialización del instrumento, pero su uso ha disminuido ya que el proceso de optimización depende mucho de la matriz, lo que la hace muy engorrosa y limita su utilización a los procesos de investigación.

Los fluidos supercríticos tienen densidades similares a las de los líquidos pero con mayores coeficientes de difusión y bajas viscosidades, similares a la de los gases, por lo que la extracción es más rápida que con líquidos orgánicos. El poder solvente de un fluido supercrítico puede modificarse con cambios de la presión y, en menor proporción, por la temperatura. Por el contrario, el poder disolvente de un líquido orgánico es prácticamente constante e independiente de las condiciones. El dióxido de carbono (CO₂) ha sido el fluido de elección en la mayoría de los estudios ya que es un solvente adecuado para analitos no polares. Para compuestos más polares es necesaria la introducción de modificadores, como el metanol o el agua, para aumentar la polaridad del CO₂ y mejorar la extracción.

Se ha reportado su uso para la determinación de aflatoxinas en maíz², de vitaminas en alimentos³, de acrilamida en frutos secos, de hidrocarburos poliaromáticos (PAH) en aceites vegetales⁴, de aceites en plantas medicinales⁵, de pesticidas en frutas y vegetales⁶, de hidrocarburos de sedimentos⁷, de pesticidas organoclorados en ginsen⁸, de multiresiduos de pesticidas en miel⁹, de pesticidas en suelos¹⁰ y de pesticidas en diferentes matrices en general¹¹; a su vez, está cobrando relevancia para procesos de descontaminación de diferentes ambiental¹².

Extracción con líquidos presurizados

La extracción con líquidos presurizados (PLE) incluye una serie de técnicas de extracción que utilizan solventes a altas temperaturas y altas presión. Las altas temperaturas permiten acelerar la cinética del proceso, mientras que las altas presiones evitan que el solvente alcance su punto de ebullición. La muestra se coloca en un recipiente sellado, se pasa el solvente y se calienta, con aumento de la presión en la celda. Al final de la extracción, el extracto se evacua de la celda con nitrógeno y se transfiere automáticamente a un vial. La muestra debe ser bien homogenizada y contener la menor cantidad de agua, para lo cual es necesario añadir agentes secantes, como hidromatrix, sulfato de sodio o de magnesio anhidros.

La variable más conocida es la extracción acelerada con disolventes (ASE), la cual es empleada desde 1995 y utiliza solventes orgánicos a altas temperaturas y alta presión para lixiviar las sustancias orgánicas de matrices sólidas. En comparación con las extracciones a temperatura ambiente y a presión atmosférica, ASE ofrece mayor rendimiento por el aumento de la solubilidad, el mejoramiento de la transferencia de masa y la interrupción de la adsorción de superficie por las condiciones definidas. Según estudios previos y algunas definiciones hechas por la agencia de protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), las condiciones básicas de operación en muestras sólidas son; temperatura de 100°C, presión de 2.000 psi, tiempo de equilibrio de 5 min, tiempo de extracción de 5 min en modo estático y con una mezcla de diclorometano y acetona en proporción 1:1.

Otra variable es la extracción a altas temperaturas y presiones con agua o extracción con agua sobrecalentada (SHWE); aunque SHWE es una técnica mucho más amigable con el ambiente, su principal desventaja con respecto a la ASE es el hecho de requerir una posterior extracción con varios solventes orgánicos.

La PLE se utiliza en el análisis de muestras ambientales y alimenticias¹³ y en análisis de residuos de pesticidas en frutas¹⁴, en vegetales¹⁵, en carne¹⁶; residuos de antibióticos en leche¹⁷ y alimentos para bebés¹⁸; micotoxinas en cereales¹⁹; ésteres de bisfenol A en alimentos enlatados²⁰; PAH en peces ahumados²¹ y compuestos organoclorados alimentos y productos alimenticios²², entre otros.

Como todas las técnicas de extracción la ASE presenta baja selectividad, lo que conlleva a obtener muestras muy sucias con necesidades de limpieza, y adi-

cionalmente muestras muy diluidas con necesidad de concentración antes del análisis instrumental.

Extracción asistida por microondas

La extracción con solventes asistida por microondas, (MASE) o MAE, se fundamenta en la utilización de 2.45GHz de radiación electromagnética para desorber compuestos orgánicos de matrices sólidas. Inicialmente esta técnica era usada para el análisis inorgánico o elemental y en el año de 1986 se utilizó por primera vez para la extracción de compuestos orgánicos²³. La muestra con el solvente de extracción son irradiados con las microondas durante períodos cortos con un aumento de la temperatura que favorece el proceso de extracción. Entre los inconvenientes que presenta la técnica están la necesidad de centrifugar o filtrar la muestra después del proceso de extracción y la dificultad para ser automatizada o acoplada en sistemas on-line.

El proceso de optimización implica el control de la naturaleza de la matriz, la composición, del volumen de agente extractor, al tiempo de extracción y la temperatura. Ésta un factor crítico, ya que determina capacidad del solvente para la solubilización, pero puede conllevar a la degradación de analitos. La eficiencia de la técnica MASE ha mostrado resultados comparables con técnicas SFE Y ASE en suelo e, incluso, aparece como una alternativa a la extracción con Soxhlet, debido a que el calentamiento es más rápido y eficiente.

Cabe destacar que esta técnica está muy influenciada por la naturaleza de la matriz y se limita a la solubilidad y al momento dipolar del compuesto. Particularmente, aunque muchos compuestos son solubles en hexano, éste es un solvente transparente, tiene un momento dipolar prácticamente nulo y exhibe un leve aumento de la temperatura por efecto de la radiación; otros lo hacen en acetona con un momento dipolar mayor, y sufre calentamiento en pocos segundos, lo que constituye una fortaleza de éstos, haciendo que la mayoría de los métodos optimizados para la MAE los utilicen²⁴.

Finalmente, entre las aplicaciones más comunes de la MAE están el análisis de muestras ambientales²⁵, los procesos de tamizaje de contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente²⁶, los análisis toxicológicos de drogas de abuso²⁷, el análisis de mercurio y organomercuriales en tejido animal²⁸, las determinaciones de piretroides en suelos²⁹, la determinación de nutracéuticos en alimentos³⁰, la extracción de pectina de manzana³¹, la determinación de organoclorados en productos vegetales, el análisis de organofosforados en aceite de oliva y aceite de aguacate³² y la determinación de organoclorados en plantas aromáticas³³, entre otros.

Muestras líquidas

Extracción en fase sólida

Los pesticidas constituyen un grupo muy amplio de compuestos, cuya polaridad es muy variada; en general, son de baja polaridad y deben ser extraídos de matri-

ces acuosas con un alto contenido en agua. La extracción en fase sólida (SPE) se fundamenta en pasar la muestra a través de un disco³⁴, de una jeringa³⁵ o de un cartucho empacado con un adsorbente, con el objetivo de retenerlos. Posteriormente, se efectúa la elución con un solvente orgánico para obtenerlos en forma concentrada y limpia para la inyección directa en los sistemas cromatográficos. La variedad de compuestos ha conducido a que el desarrollo de adsorbentes sea un campo muy dinámico, empezando por el uso de tierras de diatomeas, intercambiadores iónicos y catiónicos, fases reversas, fases normales, fases poliméricas, nanotubos de carbono, materiales de inmunoafinidad y las más recientes fases mixtas (41-42).

Básicamente la técnica SPE se efectúa en cuatro pasos: el acondicionamiento, la disposición de la muestra, el lavado y la elución. En el acondicionamiento, se permea la fase sólida para que facilite la carga de la muestra y en el lavado se eliminan las interferencias. Para eluir se utiliza un solvente que extrae los analitos en un volumen pequeño, para evitar la concentración y para facilitar la disolución de la misma en otro solvente antes de su análisis. Una ventaja que tiene la SPE es el poder usarse como un proceso de extracción y purificación simultáneas³⁶.

Esta técnica ha permitido el desarrollo de muchos métodos para la determinación de pesticidas en frutas y vegetales³⁷, jugos³⁸, leche bovina³⁹, vinos⁴⁰, alimentos para bebé⁴¹ y mieles⁴², entre otros. De igual forma, permite el análisis de muestras ambientales⁴³, muestras de aire⁴⁴, en aguas residuales⁴⁵, en sedimentos⁴⁶ y en agua para consumo humano⁴⁷, entre otras.

Dispersión de la matriz en fase sólida

La dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) es una técnica alterna a la SPE, desarrollada en 1989 por S. Barker y colaboradores⁴⁸. Inicialmente la técnica se utilizaba para la preparación, extracción y fraccionamiento de muestras sólidas; sin embargo, su uso se ha extendido a muestras semisólidas, viscosas e incluso muestras líquidas⁴⁹, cuidando básicamente el tiempo de incubación para garantizar la interacción entre los constituyentes (15 minutos a 2 horas).

El fundamento de la MSPD consiste en homogenizar en un mortero la muestra con un agente dispersante (sólido abrasivo) con el objetivo de garantizar el proceso de disrupción de la muestra, a la vez que se crea una nueva fase. La selectividad de la técnica depende básicamente de la naturaleza del agente dispersante y de las propiedades del solvente utilizado para la elución. La mayoría de los procedimientos emplean sorbentes lipofílicos tipo C18 y en algunos casos C8, pero se vienen utilizando compuestos anhidros como los sulfatos de magnesio o de sodio anhidros y sílice que eliminan el agua. Cuando se completa la dispersión, el material finamente homogenizado se transfiere a una columna para eliminar las interferencias o para retener las interferencias y eluir los analitos directamente⁵⁰.

Entre las ventajas de la MSPD con respecto a los métodos clásicos, se pueden considerar:

- Menor proceso de manipulación de la muestra.
- Se elimina de formación de emulsiones.
- Disminuye el consumo de solventes.
- Aumenta la eficiencia de la extracción debido a la gran exposición del material al agente extractante.

Entre los factores que influyen en el proceso están el tamaño de partículas con respecto a la velocidad de elución, la relación entre el material dispersante y el peso de la muestra (se recomienda 1:4), el tipo de solvente y el volumen del elución.

Pese a su homología con la técnica SPE, las diferencias más notorias entre ambas son básicamente que la MSPD permite una disrupción completa y una dispersión total de la muestra, proporcionando una mayor superficie de contacto para la extracción, mientras que en la SPE no hay etapa de dispersión y ésta debe efectuarse en un paso previo para obtener una solución. Adicionalmente, en la SPE, la muestra se retiene en la parte superior de la columna; mientras que en la MSPD la muestra es dispersada en toda la columna, con mayores interacciones físicas y químicas dentro del sistema⁵¹.

Entre las aplicaciones de la MSPD sobresale la determinación de compuestos organometálicos en muestras biológicas y sedimentos⁵², compuestos policlorados y polibromados en piensos⁵³, quinolonas y pesticidas en tejido porcino⁵⁴, pesticidas en vegetales⁵⁵, acrilamida en papas fritas⁵⁶, dexametasona y prednisolona en leche bovina⁵⁷, pesticidas en jugos de frutas⁵⁸, pesticidas en manzanas, peras y albaricoques⁵⁹, lindano y sus isómeros en frutas, trigo y plantas medicinales⁶⁰, multiresiduo de pesticidas en cítricos⁶¹ y aceites esenciales, entre otros⁶².

Microextracción en fase sólida

La microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica que desarrolló Pawliszyn⁶³, la cual no utiliza solventes y está basada en el reparto de los analitos entre la matriz y una fibra soporte de sílice fundida cubierta con una fase estacionaria que retiene los analitos por afinidad. Esta técnica es aplicable a diferentes matrices y en diferentes estados⁶⁴. En el caso particular de los pesticidas, éstos pueden ser extraídos por inmersión directa de la fibra en la muestra líquida o mediante el análisis del espacio de cabeza (HS).

El proceso de calibración de un método SPME es crítico y debe controlar los factores que afectan la eficiencia del proceso⁶⁵. Entre los factores a tener en cuenta están el tipo y el espesor de la fibra, el pH, el tiempo de adsorción, la temperatura, la adición de sales y el efecto de la matriz. Las fases polares (poliacrilato-PA) ex-

traen compuestos como los fenoles, mientras que el polidimetilsiloxano (PDMS) es el adsorbente adecuado los hidrocarburos. La temperatura favorece la volatilización de los pesticidas y su concentración en el espacio de cabeza aumenta, aunque, no controlar la temperatura disminuye la eficiencia del proceso ya que conduce a la desorción de los compuestos de la fibra. Se recomiendan temperaturas entre 50 y 90°C, tiempos de exposición mayores de 60 minutos, valores de pH próximos al pH neutro, control del material particulado, compuestos de baja volatilidad y la concentración para no obtener porcentajes de recuperación por debajo de los reales.

La SPME ha permitido aplicaciones para la determinación de drogas de abuso en sangre⁶⁶, de contaminantes orgánicos en matrices ambientales⁶⁷, de productos metabólicos en bioanálisis⁶⁸ y de nutrientes, aditivos y contaminantes en alimentos⁶⁹, entre otros. En cuanto a pesticidas en alimentos, se han desarrollado metodologías para la determinación de pesticidas en leche bovina⁷⁰, en jugos de cítricos y uva⁷¹, en carambolo, guayaba y fresa⁷², en jugos naturales y comerciales de frutas⁷³, entre otros.

Extracción mediante barra de agitación-SBSE

Esta técnica fue desarrollada en 1999 por Baltussen y colaboradores⁷⁴. La SBSE utiliza una barra de agitación magnética recubierta con una fase estacionaria tipo PDMS, que interactúa con la muestra acuosa por un tiempo entre 30 y 240 min. para su posterior extracción con solvente o desorción térmica antes de ser analizados por cromatografía⁷⁵.

Esta técnica se ha empleado para la determinación de compuestos traza en diferentes matrices⁷⁶, disruptores endocrinos en sedimentos y lodos⁷⁷, medicamentos de acción central en fluidos biológicos⁷⁸, fungicidas en vino⁷⁹, pesticidas en frutas y vegetales con electroforesis capilar⁸⁰, organofosforados en pepino y papa⁸¹, multi-residuo de pesticidas en frutas, vegetales y alimentos para bebé⁸² y piretroides en hojas de tabaco y te⁸³, entre otros.

Metodología Quechers

Anastassoades y colaboradores, en el año 2003, desarrollaron una metodología para determinar rutinariamente multi-residuos de pesticidas en frutas y vegetales a la que denominaron QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe)⁸⁴. Esta técnica se fundamenta en la extracción de una muestra representativa y homogénea (10–15 g) con un solvente miscible en el agua, como la acetona o el acetonitrilo, seguido de la separación de las dos fases para que el analito migre de la fase acuosa a la fase orgánica mediante la adición de sales como el cloruro de sodio, sulfato de sodio o sulfato de magnesio. Adicionalmente, junto a las sales se adicionan compuestos que ayuden a ejercer un efecto tampón del pH como el

acetato o el citrato para estabilizar pesticidas de carácter básico y de esta forma mejorar la recuperación no solo de éstos, sino, de compuestos con una alta polaridad o muy planares⁸⁵. Posteriormente, se contempla una etapa de extracción en fase sólida dispersiva, para lo cual se adiciona un adsorbente SPE, tipo amina primaria-secundaria (PSA) para retirar azúcares, ácidos grasos y otros componentes de la matriz para eliminar clorofilas y carotenoides se recomienda la utilización de PSA con carbón grafitizado (GCB), y para productos como cereales y frutas cítricas que contenga un alto contenido de ceras, se recomienda incluir C18 o C8, e incluso someter la solución a refrigeración.

La técnica QuEChERS como tal o con algunas modificaciones ha permitido la determinación de un espectro muy amplio de pesticidas en frutas y vegetales⁸⁶, cereales⁸⁷, productos pesqueros⁸⁸, oleaginosas⁸⁹, vinos⁹⁰, alimentos grasos como leche y huevo⁹¹, alimentos para bebé a base de carne⁹², jugos de frutas⁹³ y miel, entre otros. Adicionalmente, se utiliza para la determinación de drogas veterinarias en diferentes alimentos⁹⁴, productos farmacéuticos en sangre⁹⁵, compuestos fenólicos en suelos agrícolas⁹⁶, micotoxinas en cereales⁹⁷ y trihalometanos en suelos⁹⁸, entre otros.

En conclusión, la elección del procedimiento de tratamiento de la muestra constituye un factor crítico para la determinación de contaminantes en subtrazas, hace complejo el diseño experimental y garantiza que la manipulación de la muestra y el instrumento tengan la menor incidencia en el resultado final.

Métodos de limpieza o Clean-Up

En general las técnicas de extracción se caracterizan por ser no específicas y por aplicarse a matrices muy complejas cuya composición en la mayoría de los casos no se conoce totalmente, lo que conlleva a que se presente un porcentaje elevado de producto coextraíbles. Lo anterior se ve reflejado no solo en la disminución de los porcentajes de recuperación, sino, en la contaminación de los sistemas cromatográficos, enmascaramiento de señales instrumentales, turbiedad, formación de emulsiones y procesos de precipitación, entre otros.

La eliminación de compuestos coextraídos se efectúa mediante extracción líquido-líquido y más recientemente se utiliza la SPE, la cual demanda un consumo menor de solvente, permite utilizar diferentes tipos de adsorbentes (poliméricos, polímeros de impresión molecular, (MIT) polares, de intercambio iónico, apolares y neutros, entre otros) y se favorece por pretratamientos. Para compuestos disueltos en solvente apolar se utilizan adsorbentes polares (florisil, sílice y alúmina) y para los compuestos disueltos en solventes polares se utilizan adsorbentes apolares (C18, C8, C2, ciclohexilo y fenilo entre otros)⁹⁹.

La selección del adsorbente ha sido un proceso dinámico, desde la utilización de carbón activado, pasando por carbón grafitizado hasta el uso de carbón grafiti-

co poroso. De los anteriores, es interesante destacar las bondades del carbón grafitizado el cual exhibe una gran capacidad de aislar moléculas polares y el carbón grafitizado poroso por su capacidad de aislar moléculas planas. Recientemente, los adsorbentes poliméricos porosos (copolímeros de estireno y divinilbenceno modificados) son los más utilizados debido a su estabilidad en amplios intervalos de pH y a su eficiencia para la purificación de extractos contaminados con compuestos tanto polares como apolares¹⁰⁰.

Cabe destacar que otros adsorbentes ampliamente utilizados son los de intercambio iónico¹⁰¹, en los cuales se aprovechan las propiedades iónicas mediante modificaciones del pH del medio y utilización de un buffer para la elución; a su vez, los adsorbentes de afinidad, en los cuales se utilizan anticuerpos inmovilizados que permiten la purificación selectiva de los extractos¹⁰². Finalmente, se están desarrollando adsorbentes fundamentados en MIP, los cuales dan buenos resultados para pesticidas difícilmente recuperables¹⁰³.

Determinación analítica

Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC) es una de las técnicas más utilizada para el análisis de residualidad de pesticidas volátiles en matrices ambientales, biológicas y en alimentos. Las primeras fases estacionarias utilizadas fueron columnas empaquetadas con diferentes tipos de siliconas; en la actualidad se opta por el uso de columnas capilares de diferentes espesores de película, diferente longitud y diferentes diámetros¹⁰⁴.

El uso de columnas capilares con lleva a una reducción del volumen muestral, lo cual está condicionado al tipo de inyección que se utilice. Lo anterior es posible gracias a la utilización de inyectores tipo divisor (inyección en split), donde se inyecta un 1 μL pero sólo entra al capilar 0.01 μL ; el resto es desechado. Esta técnica impide la saturación de la columna, pero lleva a una pérdida significativa de la muestra. Cuando se realizan análisis en cantidades menores de muestra con concentraciones del orden de partes por billón (trazas), el método de inyección split introduciría muy poco volumen en la columna, para lo cual se requiere de solvente o de inyección sin división (inyector en splitless) caso en el cual, la muestra completa, incluyendo el solvente, se inyecta en la columna a través de un vaporizador instantáneo caliente. Para evitar coleo del solvente se abre el puerto de inyección después de 30s hacia la atmósfera cuando la mayor parte del solvente y toda la muestra hayan entrado en la columna. El tiempo óptimo antes de esa descarga es crítico; si es corto se produce pérdida de los componentes de la muestra, mientras que si es largo se produce un pico grande del solvente, que interfiere con la señal de algunos de los picos de interés.

Existen alternativas de inyección para sistemas cromatográficos, como los sistemas de purga y trampa (P&T)¹⁰⁵, los cuales se utilizan para separar y concentrar compuestos volátiles. Comparado con otros sistemas, los sistemas (P&T) están en capacidad de extraer el 100% del compuesto de la muestra y en especial para la separación de compuestos polares de muestras polares. El funcionamiento de estos sistemas se fundamenta en el burbujeo de helio como gas de purga y la utilización de materiales adsorbentes (tenax o tamices moleculares de carbono). Adicionalmente, junto a los sistemas P&T, se dispone de sistemas de (HS)³³, el cual es una alternativa similar a los sistemas convencionales de extracción con Soxhlet, pero que evita la pérdida de los componentes volátiles. Este método cobra mucha importancia cuando se parte de una muestra sólida, la cual se coloca en un vial hermético, se calienta durante un tiempo determinado hasta alcanzar el equilibrio y permitir que los compuestos volátiles se transfieran al HS del vial (aire), se toma una alícuota, se inyecta en el sistema cromatográfico y se procede con la desorción¹⁰⁶.

Finalmente, la microextracción en fase sólida (SPME), a pesar de sus características como método de extracción, constituye una alternativa muy completa para la introducción de muestras en los sistemas cromatográficos. Quizá una de sus mayores ventajas la constituye el no uso de solventes y su alta sensibilidad; sin embargo, la optimización de las variables (pH, temperatura, tiempo, concentración de sales y solvente, entre otras.) constituye un proceso complejo para las diferentes matrices¹⁰⁷.

La heterogeneidad estructural de los pesticidas ha permitido el desarrollo de diferentes sistemas de detección para los sistemas GC, con el objetivo de aumentar la especificidad y disminuir los límites de detección. Entre los detectores más utilizados se destacan: el detector de ionización de llama (FID)¹⁰⁸, el detector fósforo-nitrógeno (NPD)¹⁰⁹ o detector termoiónico (TID), utilizado para el análisis de compuestos que posean átomos de nitrógeno y/o átomos de fósforo, el detector de microcaptura de electrones (μ ECD)¹¹⁰ específico para compuestos grupos electronegativos y los recientes acoples a la espectrometría de masas, tipo cuadrupolo (GC-MS)¹¹¹, sistemas de masas en tándem como el triple cuadrupolo (GC-MS/MS)¹¹², trampa de iones (GC-IT/MS)¹¹³ y sistemas de alta resolución como el sistema de tiempo de vuelo (GC-TOF-MS)¹¹⁴ y los sistemas de cromatografía de gases bidimensional (GCxGC/TOF-MS)¹¹⁵. De igual forma, los anteriores acoples permiten adquirir datos en modo scan o modo de barrido y en modo SIM o monitoreo de ion seleccionado, el cual solo toma las masas típicas del compuesto de interés, incrementado la sensibilidad entre 5 y 100 veces¹¹⁶.

Principales analizadores¹¹⁷

- Cuadrupolar: consiste en dos pares de electrodos alineados paralelamente entre sí, que pueden ser de sección hiperbólica, elíptica o circular. Mediante la aplicación a

cada pareja de electrodos opuestos de un voltaje y radiofrecuencias específicos, podemos ir enfocando a través de este túnel los distintos iones según su valor de m/z . Cuantitativamente este analizador es muy robusto.

- Tiempo de vuelo¹¹⁸: los iones son movilizados en línea recta dentro del “tubo de vuelo”, con distintas velocidades hasta llegar al detector en orden ascendente de masa. Este analizador proporciona una excelente selectividad y sensibilidad, y los modelos más recientes presentan buenas fortalezas cuantitativas.
- Trampa de iones (IT): este analizador está formado por tres electrodos: el electrodo anular, el electrodo de entrada y el electrodo de salida, que forman una cavidad en la cual es posible almacenar y analizar iones. El incremento del potencial de la radiofrecuencia desestabiliza la órbita de los iones impulsando su salida de la trampa al detector de acuerdo con su valor de m/z . Una gran ventaja de éste analizador la constituye el hecho de permitir realizar masas en tándem, aunque cuantitativamente no sea el mejor.
- Sector magnético (doble enfoque): este analizador permite determinar masas exactas y funciona a través de la utilización de un potencial que logra acelerar los iones y los conduce a través de un campo magnético perpendicular por la línea de vuelo del ión, éstos siguen un camino circular cuyo radio es proporcional a su valor m/z . Éste analizador exhibe excelentes características operativas, muy bajos límites de detección, pero sus costos de operación aún son muy elevados.

La MS comprende un conjunto de técnicas utilizadas para la medición de la masa exacta de los iones y su abundancia en la fase gaseosa. La fuente de ionización, el analizador de masa y el detector le brindan una gran robustez y precisión. Adicionalmente, entre las variables del sistema está el poder efectuar fragmentación del ión base, generando un segundo espectrómetro, lo que es muy útil, y puede ser aprovechando para la elucidación estructural. La anterior variable se conoce con el nombre de espectrometría de masa/masa o en tándem (MS/MS)¹¹⁹.

El proceso de MS/MS se fundamenta en la ionización de la muestra, previa selección de una masa, la cual pasa hasta la cámara de colisiones. En la cámara de colisiones, los átomos del gas fragmentan y los iones producen otros iones y fragmentos neutros. Los iones que salen son analizados por el segundo espectrómetro de masa. Existen diferentes analizadores de masas en tándem, pero para las determinaciones de pesticidas los más utilizados son el triple cuadrupolo (QqQ) y la IT.

Los equipos de MS/MS con QqQ realizan monitoreos más rápidos que la trampa de iones, lo cual influye en el desarrollo del análisis cromatográfico. Uno de los tipos de monitoreo es el de reacción múltiple, que es más rápido que el monitoreo de un ion seleccionado de la IT, permite barrido, confirmación y cuantificación por análisis. Los otros tipos de monitoreo son los de una reacción y de ion seleccionado, los cuales permiten identificar y cuantificar simultáneamente trazas de multi-residuos de pesticidas, en matrices complejas, debido a su selectividad y velocidad de adquisición; sin embargo, solo se pueden monitorear los compuestos seleccionados y se pierde información muy importante para del

tamizaje. Lo anterior se corrige si se desarrollan métodos compuestos, dentro de los cuales se realiza un escaneo completo de la muestra para los analitos de interés y posteriormente se realiza la confirmación y cuantificación. Es importante resaltar el modo SIM produce un aumento considerable de la sensibilidad con respecto al modo de barrido¹²⁰.

Una desventaja de la IT es la vulnerabilidad a efectos producidos por iones cargados, lo que afecta la calidad del espectro de masa, incluyendo la resolución y la precisión de la masa; además, pueden realizar un solo tipo de monitoreo: el escaneo de un ión seleccionado. Adicionalmente, las IT necesitan etapas intermedias asociadas al tiempo requerido para sostener y mover iones. Por lo anterior, este analizador y los analizadores de ciclotrón iónico, permiten estudios MSⁿ, donde n cobra relevancia hasta valores de 4. La MS/MS ofrece grandes ventajas para el análisis cualitativo ya que posee muy buena sensibilidad y selectividad¹²¹.

La MS de alta resolución constituye la metodología de mayor sensibilidad y selectividad, pues permite la determinación de compuestos a niveles de partes por trillón en diferentes tipos de matrices. Su alto costo y complejidad operativa han orientado al empleo de otros analizadores con modificaciones en el sistema cromatográfico, en los sistemas de inyección y en las etapas previas de la cromatografía. Algunas de las recomendaciones a tener en cuenta son:

- Utilización de inyectores de vaporización a temperatura programada (PTV) acoplados a sistemas de masas o sistemas de masas en tándem, los cuales permiten inyectar mayor volumen de muestra (50 a 100 µL), incrementando de esta forma la sensibilidad. La selectividad en estas determinaciones la proporcionan las específicas adquisiciones obtenidas por espectrometría de masas en tándem¹²².
- Implementación de cromatografía de gases rápida resolución (FGC), con columnas capilares cortas, mayor flujo de gas portador y rampas muy elevadas de temperatura para conseguir tiempos de retención mucho más cortos (hasta dos órdenes de magnitud), pero se requieren analizadores de tiempo de vuelo (TOF).
- Aprovechamiento de los sistemas bidimensionales (GCxGC-TOF-MS), en los que se acoplan directamente dos columnas con distintos sistemas de separación; generalmente la primera es una columna apolar convencional, mientras que la segunda es una columna polar muy corta, por lo que los compuestos que coeluyan en la apolar se separarán correctamente en la polar, mejorando ostensiblemente la selectividad, pero se requiere un sistema que obtenga rápidamente los espectros de masas como los detectores TOF¹²³.

Mecanismos de ionización¹²⁴

- Ionización por impacto electrónico (EI)

Es el método de ionización más antiguo, más universal y más ampliamente utilizado para la ionización de muestras gaseosas. Constituye una técnica muy

agresiva de ionización que da lugar a la formación de muchos fragmentos que complican la interpretación del espectro. El mecanismo de ionización se fundamenta en introducir la muestra en fase gaseosa dentro de la cámara de ionización para que las moléculas sean bombardeadas con electrones y colisionen entre sí. Cuando la energía de los electrones es mayor que el potencial de ionización de la molécula, ésta se ioniza positivamente, formando el ión molecular y liberando un electrón. Si el proceso de formación del choque es eficaz, el electrón transmite energía en exceso para provocar ruptura de uno o más enlaces del ión molecular y producir una fragmentación característica de la molécula. Este patrón de fragmentación específico es la “huella digital” de la molécula y permite garantizar su identificación.

Por lo general, el proceso de ionización produce cationes con una sola carga, aunque para compuestos con elementos muy electronegativos (haluros), se pueden formar aniones. La eficiencia de la ionización depende de la naturaleza del analito, pero aumenta con la energía de los electrones. Universalmente se ha adoptado como energía estándar electrónica el valor de 70 eV, con el objetivo de poder comparar directamente los espectros producidos en diferentes laboratorios y de esta forma editar librerías de espectros. Entre las librerías disponibles en el mercado se destacan Wiley [NIST, Wiley] o la del National Institute of Standards and Technology (NIST).

- Ionización química (CI)

Éste método utiliza un gas reactivo (metano, amoníaco o butano, entre otros), el cual es introducido en la cámara de ionización, en donde es bombardeo por electrones para ser ionizado. Se recomienda que la proporción relativa de gas reactivo: muestra sea al menos de 1000:1, para evitar ionización por impacto electrónico del analito. La estabilidad de los fragmentos obtenidos es mayor, mientras que su número es menor, debido a que los choques en este tipo de ionización no poseen excesos de energía.

La reacción más común se fundamenta en la transferencia de un protón del gas ionizado al analito, dando lugar a la formación de cationes debido a que la afinidad protónica de la molécula es mayor que la del gas reactivo, por lo que el empleo de gases reactivos con una elevada afinidad protónica producirá una menor fragmentación de la molécula. Adicionalmente se producen reacciones de cambio de carga, adición electrofílica o sustitución nucleofílica. Cuando se ionizan compuestos con átomos electronegativos, la ionización química también puede generar aniones, de gran importancia para el análisis de pesticidas halogenados, retardantes de llama, PCB, polibromados bifenilos (PBB) y piretroides, entre otros.

Cromatografía de líquidos

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)¹²⁵ es una técnica que empleada para el análisis de compuestos polares o térmicamente lábiles que no pueden ser

analizados directamente por GC; razón por la cual la HPLC es la alternativa para el análisis de casi el 80% de los compuestos que existen. La mayoría de las metodologías HPLC que se han desarrollado para el análisis de pesticidas se fundamenta en métodos de fase reversa, cuya fase estacionaria apolar está formada por sistemas octilo (C8) u octadecilo (C18) y la fase móvil es relativamente polar. Entre las variables de la cromatografía líquida se destacan:

Cromatografía iónica

La cromatografía iónica (IC)¹²⁶ permite métodos prácticos y eficaces para la separación de iones mediante la utilización de resinas de intercambio iónico (catiónico o aniónico) y detectores de conductividad.

Cromatografía de adsorción

La cromatografía de adsorción (líquido-sólido), es la forma clásica HPLC. La sílice y la alúmina son las fases más utilizadas; sin embargo, la sílice, debido a la gran variedad de modificaciones químicas que permite y a su mayor capacidad de carga, es la más aplicada en la mayoría de las aplicaciones.

Cromatografía de reparto

Ha sido el tipo de cromatografía de líquidos (LC) más utilizada. La mayoría de las aplicaciones desarrolladas se han orientado a compuestos neutros polares de bajo a moderado peso molecular (< 2800), aunque recientemente hay desarrollos para compuestos iónicos. Existen dos variables de cromatografía de reparto: cromatografía líquido-líquido y cromatografía químicamente enlazada. Ambas se fundamentan en la forma como se retiene la fase estacionaria sobre las partículas del soporte. Con respecto a las polaridades relativas de la fase móvil y de la fase estacionaria, hay dos tipos de cromatografía de reparto: la cromatografía en fase normal (NP) y la cromatografía en fase reversa (RP). En la cromatografía RP, la fase estacionaria es no polar (hidrocarburo) y el pH de trabajo menor de 7.5 y la fase móvil es relativamente polar (agua, acetonitrilo o metanol). En consecuencia, en un método cromatográfico en NP los compuestos menos polares eluyen primero, debido a ser más solubles en la fase móvil y un aumento de la polaridad de la fase móvil provoca una disminución del tiempo de elución. Por el contrario, en métodos cromatográficos en RP, los componentes más polares eluyen primero, y un aumento en la polaridad de la fase móvil aumentará el tiempo de elución¹²⁷.

Cromatografía de exclusión por tamaño

La cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía por permeación en gel (GPC) es ampliamente utilizada para la separación de moléculas de alto peso molecular. La fase estacionaria está constituida por una red de partículas pequeñas

de sílice o poliméricas (10 μm) con uniformidad de poro, en donde las moléculas son atrapadas y eliminadas de la fase móvil. Las moléculas de mayor tamaño de poros de la fase estacionaria son excluidas y son las primeras que eluyen, y viceversa. Cabe destacar que en este tipo de cromatografía no se presenta interacción química o física entre los analitos y la fase estacionaria¹²⁸.

Entre los componentes de mayor relevancia en los sistemas cromatográficos donde mayores desarrollos se han obtenido, son los sistemas de detección. Los detectores para HPLC son fundamentados en su respuesta a las propiedades de la fase móvil, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica, y la densidad, que se modifica por la presencia de los analitos, o detectores fundamentados en una propiedad del soluto como la absorbancia ultravioleta (UV), la fluorescencia, o la intensidad de difusión. El detector más utilizado a pesar de su baja sensibilidad y selectividad es el detector UV de longitud de onda fija (102) o el detector UV de onda variable (detector de arreglo de diodos-DAD)¹²⁹; adicionalmente, se utilizan detectores de absorción en el infrarrojo, detectores de fluorescencia (FLD)¹³⁰, detectores de índice de refracción, detectores electroquímicos, detectores de conductividad, detectores de dispersión de la luz (ELSD)¹³¹ detectores de espectrometría de masas (HPLC/MS) y de masas en tándem (HPLC-MS/MS)¹³². Los sistemas HPLC-MS presentan la ventaja de analizar un grupo muy amplio de pesticidas con la obtención de información estructural que permite su identificación.

Es importante resaltar que a diferencia de la GC, en la HPLC, no existe un detector tan universal como el FID y ni uno tan confiable como el TCD. Uno de los mayores retos y desarrollos de la HPLC ha sido el perfeccionamiento de los detectores.

Las mayores dificultades para el acoplamiento entre los sistemas HPLC y MS son básicamente la ionización de analitos no volátiles y térmicamente inestables, la composición de la fase móvil por constituyentes o aditivos no volátiles y el alto vacío del espectrómetro de masas con respecto a los flujos manejados por el sistema cromatográfico. Para solucionar las anteriores dificultades se han desarrollado interfases como la moving-belt, la introducción directa, la flujo continuo (FAB), la termospray, la particle-beam, la presión atmosférica (API) como el electrospray (ESI) y la de ionización química a presión atmosférica (APCI) y la desorción/ionización de la matriz asistida por láser (MALDI)¹³³.

Entre los requisitos y especificaciones que debe cumplir una interfase HPLC-MS, es necesario su fácil manejo, bajo costo, bajos límites de detección, buena capacidad de cuantificación, baja interferencia de los solventes y sus impurezas, no producir modificaciones de los analitos, permitir elución por gradiente, no propiciar restricciones en la composición de la fase móvil, permitir el uso de aditivos volátiles y no volátiles, flujos entre 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 2 mL/min , enriquecimiento de la muestra con respecto al solvente, no producir ensanchamiento de los picos ni pérdida de resolución, permitir alto vacío ($<10^{-3}$ Pa), tener opción de elegir el método de ionización y permitir selección de ión positivo e ión negativo, entre otras.

El electrospray (ESI) es un método de ionización a través del cual los iones presentes en una solución pueden ser transferidos a la fase gaseosa. El proceso se fundamenta en la aplicación de un campo eléctrico (3-6 KV) a través de una interfaz que forma una celda electroquímica. En esta ionización hay tres procesos importantes que deben ocurrir con el fin de garantizar la transferencia de moléculas del eluyente a los iones de la fase gaseosa en el espectrómetro de masas. Estos procesos son: la producción de gotitas cargadas en la punta capilar, la contracción de las gotitas cargadas y la producción de iones en fase gaseosa. La ionización mediante electrospray es altamente compatible con los analitos de moderada a alta polaridad, con masas moleculares hasta 100.000 Dalton e ionizables en solución¹³⁴.

La ionización APCI¹³⁵ comprende un procedimiento similar de formación del spray, pero lo que se produce es una fuerte descarga en la fuente que genera un plasma de iones reactivos del solvente que origina el mecanismo de ionización de la muestra por ionización química (CI), normalmente por adición o extracción de un protón. Este mecanismo, que coexiste con el de evaporación iónica, produce abundantes iones $(M+H)^+$ y abundantes iones $(M-H)^-$.

Otros métodos analíticos

Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC)

Es una técnica cromatográfica en la que la temperatura y presión de la fase móvil se mantienen por encima de los valores que definen su punto crítico, permitiendo el análisis de compuestos poco volátiles y termolábiles. Quizá una de las características de mayor relevancia de esta es la posibilidad de eliminar la fase móvil facilitando su acople directo con una técnica espectroscópica o la posibilidad de utilizar un mismo medio como agente extractivo y fase móvil. La SFC ha sido utilizada para el análisis de pesticidas moderadamente polares y termolábiles en cortos tiempos de retención, y a través de diferentes sistemas de detección¹³⁶.

Electroforesis capilar (CE)¹³⁷

La CE es una técnica para la separación de moléculas según su movilidad en un campo eléctrico a través de una matriz porosa, la cual las separa por tamaño molecular y carga eléctrica, dependiendo de la técnica que se use. La técnica clásica utiliza un soporte poroso inmerso en un electrolito sujeto a los electrodos que generan la corriente. La muestra se deposita en forma de un pequeño trazo transversal en la tira. Esta es una técnica de separación desarrollada a partir de la HPLC, que permite separar biomoléculas y compuestos de bajo peso molecular. La CE utiliza capilares con un diámetro entre 15 y 150 μm , una longitud entre 20 y 80 cm, una carga de solución amortiguadora y un detector ubicado en un extremo del capilar que transduce un electroferograma.

Entre las variables electroforéticas más utilizadas se distinguen:

- Electroforesis capilar en gel (CGE): el relleno del capilar se efectúa con un electrolito y un gel (poliacrilamida o agarosa).
- La electroforesis capilar en zona o en disolución libre (CZE): es la forma más utilizada y se fundamenta en que el capilar es embebido por el electrolito a través de un buffer ácido (fosfato o citrato), básico (borato), o anfótero. Los principales factores a controlar para la realización de una separación son la composición, la concentración y el pH del electrolito, y el voltaje aplicado.
- La electroforesis capilar electrocinética micelar (MEKC): es similar a la CZE, pero a la fase móvil se le añade un ion para formar micelas cargadas. Estas micelas por afinidad retienen los compuestos neutros. Es una herramienta muy útil para la separación de algunos enantiómeros.
- Electroforesis de Isoelectroenfoque capilar (CIEF) o electroforesis en soporte: se fundamenta en la disposición de un gradiente lineal de pH lineal en un capilar revestido con un anfótero. Cada compuesto migra con respecto a su punto isoeléctrico, y bajo presión hidrostática éste se desplaza hacia el detector. Es una técnica muy útil en la separación de péptidos, llegando a tener eficiencias con compuestos cuyo punto isoeléctrico difiere entre 0.02 unidades de pH.

Técnicas inmunoanalíticas¹³⁸

La aplicación de las técnicas inmunoanalíticas (IT) para el análisis de pesticidas en alimentos y muestras ambientales ha aumentado significadamente en los últimos años. Éstas se aprovechan del alto grado de especificidad de la interacción anticuerpo-antígeno con mínima manipulación de la muestra, y de proporcionar límites de detección y cuantificación entre partes por trillón (ppt) y ppb en análisis de agua, y un poco mayores en otros tipos de muestras.

En un típico inmunoensayo competitivo, un antígeno es marcado e incubado junto con los anticuerpos del analito inmovilizado en un soporte adecuado. El marcador puede ser un isótopo radioactivo (radioinmunoensayo), una enzima (enzimoinmunoensayo)¹³⁹, un fluorocromo (fluoroinmunoensayo) u otro marcador cuantificable. Luego, se añade la muestra, y los antígenos (analitos) compiten con los antígenos marcados por los anticuerpos. Después del período de incubación y de una etapa de lavado, se determina la cantidad de antígeno marcado unida a los anticuerpos, la cual debe ser inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra.

Sensores o biosensores

Un biosensor es un dispositivo de análisis conformado por un elemento biológico de reconocimiento (célula, tejido, receptor, ácido nucleico, enzima, ribozima o anticuerpo, entre otros), o nanomateriales (nanopartículas, nanocompuestos), materiales inteligentes o compuestos biomiméticos (aptámeros, polímeros de mi-

croporosidad intrínseca, sondas de ácidos nucleicos), asociado a un mecanismo que garantiza la detección e interpretación de la variación de propiedades ópticas, fisicoquímicas, eléctricas, entre otras, obtenidas de la interacción entre el analito y el dispositivo analítico. Cabe destacar que las características fisicoquímicas del analito de interés son las determinantes para la elección del material biológico/biomimético, mientras que el tipo de elemento de reconocimiento es el que determina el sistema transductor¹⁴⁰.

Conclusión

Independiente del tipo de analito y en especial del tipo de pesticida objeto de análisis en matrices ambientales y alimenticias, el tratamiento de la muestra constituye la etapa más crítica para el análisis cuantitativo. Entre más etapas se involucren en el procedimiento, la probabilidad de perder los compuestos de interés aumenta. Sin embargo, una buena planeación de a la metodología de extracción, concentración y cuantificación determina la fiabilidad de los datos obtenidos.

La cromatografía constituye la herramienta instrumental de mayor aplicación y proyección para la determinación de contaminantes orgánicos. Las fortalezas de su asociación con las variables de espectrometría de masas garantizan determinaciones altamente precisas y reproducibles. Aunque la cromatografía gaseosa cobra gran relevancia, sin duda alguna la cromatografía líquida de alta eficiencia, de resolución rápida constituye la técnica del futuro con la cual se podrá tener una aproximación muy grande a las concentraciones reales de un contaminante dentro de una matriz de interés.

Pese a lo anterior, el desarrollo de un método cromatográfico constituye varias etapas que no solo consumen tiempo, sino, que demandan un amplio conocimiento químico y un trabajo riguroso y responsable. Poseer técnicas complementarias como los inmunoensayos y los biosensores contribuyen no solo a realizar monitoreos en tiempo real, sino, a tener indicadores previos antes de proceder con el desarrollo de una técnica de alta precisión y resolución.

Referencias bibliográficas

1. Herrero M, et al. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217(16):2495-511.
2. Holcomb M, et al. SFE extraction of aflatoxins (B1, B2, G1, and G2) from corn and analysis by HPLC. *The Journal of Supercritical Fluids*. 1996;9(2):118-21.
3. Berg H, et al. Determination of food constituents based on SFE: applications to vitamins A and E in meat and milk. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2000;43(1-3):391-401.
4. Zougagh M, et al. Screening and confirmation of PAHs in vegetable oil samples by use of supercritical fluid extraction in conjunction with liquid chromatography and fluorimetric detection. *Analytica Chimica Acta*. 2004;525(2):265-71.

5. Lang Q, Wai CM. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies -- a practical review. *Talanta*. 2001;53(4):771-82.
6. Lehotay SJ, Valverde-García A. Evaluation of different solid-phase traps for automated collection and clean-up in the analysis of multiple pesticides in fruits and vegetables after supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*. 1997;765(1):69-84.
7. Akinlua A, Torto N, Ajayi TR. Supercritical fluid extraction of aliphatic hydrocarbons from Niger Delta sedimentary rock. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2008;45(1):57-63.
8. Quan C, et al. Supercritical fluid extraction and clean-up of organochlorine pesticides in ginseng. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2004;31(2):149-57.
9. Rissato SR, et al. Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*. 2004;1048(2):153-9.
10. Kreuzig R, Koinecke A, Bahadir M. Use of supercritical fluid extraction in the analysis of pesticides in soil. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2000;43(1-3):403-9.
11. Motohashi N, Nagashima H, Párkányi C. Supercritical fluid extraction for the analysis of pesticide residues in miscellaneous samples. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2000;43(1-3):313-28.
12. Sunarso J, Ismadji S. Decontamination of hazardous substances from solid matrices and liquids using supercritical fluids extraction: A review. *Journal of Hazardous Materials*. 2009;161(1):1-20.
13. Nieto A, et al. Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2010;29(7):752-64.
14. Tanaka T, et al. Simple one-step extraction and cleanup by pressurized liquid extraction for gas chromatographic-mass spectrometric determination of pesticides in green leafy vegetables. *Journal of Chromatography A*. 2007;1175(2):181-6.
15. Barriada-Pereira M, et al. Comparison of pressurized liquid extraction and microwave assisted extraction for the determination of organochlorine pesticides in vegetables. *Talanta*. 2007;71(3):1345-51.
16. Poerschmann J, et al. Sequential pressurized liquid extraction to determine brain-originating fatty acids in meat products as markers in bovine spongiform encephalopathy risk assessment studies. *Journal of Chromatography A*. 2006;1127(1-2):26-33.
17. Juan C, et al. Determination of macrolide and lincosamide antibiotics by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in meat and milk. *Food Control*. In Press, Accepted Manuscript.
18. Rodríguez E, et al. Optimization of a pressurized liquid extraction method by experimental design methodologies for the determination of fluoroquinolone residues in infant foods by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217(5):605-13.

19. Pérez-Torrado E, et al. Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for determination of zearalenone in cereal flours. *Food Control*. 2010;21(4):399-402.
20. Pardo O, et al. Determination of bisphenol diglycidyl ether residues in canned foods by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2006;1107(1-2):70-8.
21. Lund M, Duedahl-Olesen L, Christensen JH. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked fish using pressurized liquid extraction with integrated fat removal. *Talanta*. 2009;79(1):10-5.
22. Wiberg K, et al. Selective pressurized liquid extraction of polychlorinated dibenzop-dioxins, dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls from food and feed samples. *Journal of Chromatography A*. 2007;1138(1-2):55-64.
23. Ganzler K, Salgó A, Valkó K. Microwave extraction : A novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1986;371:299-306.
24. Luque-García JL, Luque de Castro MD. Where is microwave-based analytical equipment for solid sample pre-treatment going? *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2003;22(2):90-8.
25. Camel V. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2000;19(4):229-48.
26. Sanchez-Prado L, Garcia-Jares C, Llompарт M. Microwave-assisted extraction: Application to the determination of emerging pollutants in solid samples. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217(16):2390-414.
27. Desrosiers NA, Betit CC, Watterson JH. Microwave-assisted extraction in toxicological screening of skeletal tissues. *Forensic Science International*. 2009;188(1-3):23-30.
28. Reyes LH, Rahman GMM, Kingston HMS. Robust microwave-assisted extraction protocol for determination of total mercury and methylmercury in fish tissues. *Analytica Chimica Acta*. 2009;631(2):121-8.
29. Esteve-Turrillas FA, et al. Microwave-assisted extraction of pyrethroid insecticides from soil. *Analytica Chimica Acta*. 2004;522(1):73-8.
30. Spigno G, De Faveri DM. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. *Journal of Food Engineering*. 2009;93(2):210-7.
31. Wang S, et al. Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*. 2007;78(2):693-700.
32. Fuentes E, Báez ME, Díaz J. Microwave-assisted extraction at atmospheric pressure coupled to different clean-up methods for the determination of organophosphorus pesticides in olive and avocado oil. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216(51):8859-66.
33. Ho W-H, Hsieh S-J. Solid phase microextraction associated with microwave assisted extraction of organochlorine pesticides in medicinal plants. *Analytica Chimica Acta*. 2001;428(1):111-20.
34. Poole CF. Solid-phase extraction with discs. In: Ian DW, editor. *Encyclopedia of Separation Science*. Oxford: Academic Press; 2000. p. 4141-8.

35. Camel V. Solid-phase extraction. In: Zoltan M, Ralph S, editors. *Comprehensive Analytical Chemistry*: Elsevier; 2003. p. 393-457.
36. Chapter 12 Solid-phase extraction: Strategies for method development and optimization. In: David AW, editor. *Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis*: Elsevier; 2003. p. 433-84.
37. 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. *Journal of Chromatography A*. 2003;1015(1-2):185-98.
38. Albero B, Sánchez-Brunete C, Tadeo JL. Multiresidue determination of pesticides in juice by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*. 2005;66(4):917-24.
39. Bogialli S, et al. Development of a multiresidue method for analyzing herbicide and fungicide residues in bovine milk based on solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2006;1102(1-2):1-10.
40. Jiménez JJ, et al. Analysis of pesticide residues in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with electron capture and nitrogen-phosphorus detection. *Journal of Chromatography A*. 2001;919(1):147-56.
41. Hercegová A, Dömötöróvá M, Matisová E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. *Journal of Chromatography A*. 2007;1153(1-2):54-73.
42. Karazafiris E, Menkissoglu-Spiroudi U, Thrasyvoulou A. New multiresidue method using solid-phase extraction and gas chromatography-micro-electron-capture detection for pesticide residues analysis in royal jelly. *Journal of Chromatography A*. 2008;1209(1-2):17-21.
43. Liska I. Fifty years of solid-phase extraction in water analysis - historical development and overview. *Journal of Chromatography A*. 2000;885(1-2):3-16.
44. Barro R, et al. Development of a sensitive methodology for the analysis of chlorobenzenes in air by combination of solid-phase extraction and headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*. 2004;1045(1-2):189-96.
45. Santos JL, et al. Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors. *Analytica Chimica Acta*. 2005;550(1-2):116-22.
46. Burkhardt MR, et al. Pressurized liquid extraction using water/isopropanol coupled with solid-phase extraction cleanup for semivolatile organic compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), and alkylated PAH homolog groups in sediment. *Analytica Chimica Acta*. 2005;549(1-2):104-16.
47. Bruzzoniti MC, et al. Determination of herbicides by solid phase extraction gas chromatography-mass spectrometry in drinking waters. *Analytica Chimica Acta*. 2006;578(2):241-9.
48. Barker SA, Long AR, Short CR. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *Journal of Chromatography A*. 1989;475(2):353-61.

49. Barker SA. Solid-phase matrix dispersion: extraction. In: Ian DW, editor. *Encyclopedia of Separation Science*. Oxford: Academic Press; 2000. p. 4148-53.
50. Capriotti AL, et al. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217(16):2521-32.
51. Barker SA. Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2007;70(2):151-62.
52. Moreda-Piñeiro J, et al. Matrix solid-phase dispersion of organic compounds and its feasibility for extracting inorganic and organometallic compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2009;28(1):110-6.
53. Carro AM, et al. Multi-residue screening of chlorinated and brominated compounds from aquaculture samples using matrix solid-phase dispersion--gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2005;1071(1-2):93-8.
54. Wang S, et al. Multiresidue determination of fluoroquinolones, organophosphorus and N-methyl carbamates simultaneously in porcine tissue using MSPD and HPLC-DAD. *Journal of Chromatography B*. 2009;877(27):2961-6.
55. Viana E, Moltó JC, Font G. Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the analysis of pesticide residues in vegetables. *Journal of Chromatography A*. 1996;754(1-2):437-44.
56. Fernandes JO, Soares C. Application of matrix solid-phase dispersion in the determination of acrylamide in potato chips. *Journal of Chromatography A*. 2007;1175(1):1-6.
57. Dési E, et al. Analysis of dexamethasone and prednisolone residues in bovine milk using matrix solid phase dispersion-liquid chromatography with ultraviolet detection. *Microchemical Journal*. 2008;89(1):77-81.
58. Radisic M, et al. Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2009;113(2):712-9.
59. Ramos JJ, et al. Ultrasonic-assisted matrix solid-phase dispersion as an improved methodology for the determination of pesticides in fruits. *Journal of Chromatography A*. 2008;1212(1-2):145-9.
60. Abhilash PC, Singh V, Singh N. Simplified determination of combined residues of lindane and other HCH isomers in vegetables, fruits, wheat, pulses and medicinal plants by matrix solid-phase dispersion (MSPD) followed by GC-ECD. *Food Chemistry*. 2009;113(1):267-71.
61. Valenzuela AI, et al. Matrix solid-phase dispersion microextraction and determination by high-performance liquid chromatography with UV detection of pesticide residues in citrus fruit. *Journal of Chromatography A*. 1999;839(1-2):101-7.
62. Dawidowicz AL, Rado E. Matrix solid-phase dispersion (MSPD) in chromatographic analysis of essential oils in herbs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010;52(1):79-85.
63. Smith RM. *Solid Phase Microextraction. Theory and Practice* by Janusz Pawliszyn. *Analyst*. 1998;123:4N.

64. Prosen H. Applications of solid phase microextraction, edited by Janusz Pawliszyn. TrAC, Trends Anal Chem. 2000;19(Copyright (C) 2010 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.):ix-x.
65. Ouyang G, Pawliszyn J. A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction. *Analytica Chimica Acta*. 2008;627(2):184-97.
66. Nagasawa N, Yashiki M, Iwasaki Y, Hara K, Kojima T. Rapid analysis of amphetamines in blood using head space-solid phase microextraction and selected ion monitoring. *Forensic Science International*. 1996;78(2):95-102.
67. Peñalver A, et al. Trends in solid-phase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1999;18(8):557-68.
68. Vuckovic D, et al. Solid-phase microextraction in bioanalysis: New devices and directions. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217(25):4041-60.
69. Kataoka H, Lord HL, Pawliszyn J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*. 2000;880(1-2):35-62.
70. Fernandez-Alvarez M, et al. Development of a solid-phase microextraction gas chromatography with microelectron-capture detection method for a multiresidue analysis of pesticides in bovine milk. *Analytica Chimica Acta*. 2008;617(1-2):37-50.
71. Zambonin CG, et al. Solid-phase microextraction - gas chromatography mass spectrometry: A fast and simple screening method for the assessment of organophosphorus pesticides residues in wine and fruit juices. *Food Chemistry*. 2004;86(2):269-74.
72. Chai MK, Tan GH. Validation of a headspace solid-phase microextraction procedure with gas chromatography-electron capture detection of pesticide residues in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 2009;117(3):561-7.
73. Cortés-Aguado S, et al. Fast screening of pesticide residues in fruit juice by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2008;107(3):1314-25.
74. Baltussen E, et al. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations*. 1999;11(10):737-47.
75. Prieto A, et al. Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217(16):2642-66.
76. David F, Sandra P. Stir bar sorptive extraction for trace analysis. *Journal of Chromatography A*. 2007;1152(1-2):54-69.
77. Tan BLL, et al. Stir bar sorptive extraction and trace analysis of selected endocrine disruptors in water, biosolids and sludge samples by thermal desorption with gas chromatography-mass spectrometry. *Water Research*. 2008;42(1-2):404-12.
78. Kassem MG. Stir bar sorptive extraction for central nervous system drugs from biological fluids. *Arabian Journal of Chemistry*. In Press, Corrected Proof.
79. Sandra P, T et al. Stir bar sorptive extraction applied to the determination of dicarboximide fungicides in wine. *Journal of Chromatography A*. 2001;928(1):117-26.

80. Juan-García A, Picó Y, Font G. Capillary electrophoresis for analyzing pesticides in fruits and vegetables using solid-phase extraction and stir-bar sorptive extraction. *Journal of Chromatography A*. 2005;1073(1-2):229-36.
81. Liu W, et al. Determination of organophosphorus pesticides in cucumber and potato by stir bar sorptive extraction. *Journal of Chromatography A*. 2005;1095(1-2):1-7.
82. 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. *Journal of Chromatography A*. 2003;1000(1-2):299-309.
83. Hou Y, et al. Determination of Pyrethroid Pesticide Residues in Tobacco Leaves and Tea Using Stir Bar Sorptive Extraction-Thermal Desorption and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*. 2007;25(1):25-9.
84. Anastasiades M, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*. 2003;86(2):412-31.
85. Lehotay SJ, Mastovská K, Lightfield AR. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *Journal of AOAC International*. 2005;88(2):615-29.
86. Abd E-MMRA, et al. Multiresidue method of analysis for determination of 150 pesticides in grapes using quick and easy method (QuEChERS) and LC-MS/MS determination. *J Food, Agric Environ*. 2010;8:602-6.
87. Shelly D, Perman CA. Multiresidue analysis of cereal grains using a modified QuEChERS method with GC-TOFMS and UPLC-MS-MS analysis. *LCGC North Am*. 2010:34-5.
88. Rawn DFK, Judge J, Roscoe V. Application of the QuEChERS method for the analysis of pyrethrins and pyrethroids in fish tissues. *Anal Bioanal Chem*. 2010;397:2525-31.
89. Cunha SC, et al. Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. *J Sep Sci*. 2007;30:620-32.
90. Jiang Y, et al. Multiresidue method for the determination of 77 pesticides in wine using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with mass spectrometry. *Food Addit Contam, Part A*. 2009;26:859-66.
91. Lehotay SJ, Mastovska K, Yun SJ. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *J AOAC Int*. 2005;88:630-8.
92. Przybylski C, Segard C. Method for routine screening of pesticides and metabolites in meat based baby-food using extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Sep Sci*. 2009;32:1858-67.
93. Romero-Gonzalez R, Garrido FA, Martinez VJL. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2008;76:211-25.
94. Aguilera-Luiz MM, et al. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr, A*. 2008;1205:10-6.

95. Plössl F, Giera M, Bracher F. Multiresidue analytical method using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood. *Journal of Chromatography A*. 2006;1135(1):19-26.
96. Padilla-Sánchez JA, et al. Application of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe-based method for the simultaneous extraction of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in agricultural soils, analyzed by using gas chromatography-triple quadrupole-mass spectrometry/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217(36):5724-31.
97. Vaclavik L, et al. Analysis of multiple mycotoxins in cereals under ambient conditions using direct analysis in real time (DART) ionization coupled to high resolution mass spectrometry. *Talanta*. In Press.
98. Herrero S, et al. Determination of trihalomethanes in soil matrices by simplified quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction and fast gas chromatography with electron capture detection. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217(30):4883-9.
99. Diehl DM. Extraction | Sorptive Extraction Methods. In: Ian DW, editor. *Encyclopedia of Separation Science*. Oxford: Academic Press; 2007. p. 1-7.
100. Huck CW, Bonn GK. Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*. 2000;885(1-2):51-72.
101. Fontanals N, et al. Mixed-mode ion-exchange polymeric sorbents: dual-phase materials that improve selectivity and capacity. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2010;29(7):765-79.
102. Senyuva HZ, Gilbert J. Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review. *Journal of Chromatography B*. 2010;878(2):115-32.
103. Koesdjojo MT, Tennico YH, Remcho VT. 18 Molecularly imprinted polymers as sorbents for separations and extractions. In: Satinder A, Henrik R, editors. *Separation Science and Technology*: Academic Press; 2007. p. 479-503.
104. Wang Z, Jocelyn Paré JR. Chapter 3 Gas chromatography (GC): Principles and applications. In: Paré JRJ, Bélanger JMR, editors. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*: Elsevier; 1997. p. 61-91.
105. Torkos K. *Sample Preparation for Gas Chromatography*: John Wiley & Sons, Ltd; 2006.
106. Green JD. Headspace analysis | Static. In: Paul W, Alan T, Colin P, editors. *Encyclopedia of Analytical Science*. Oxford: Elsevier; 2005. p. 229-36.
107. Ross C, Pawliszyn J. extraction | Solid-Phase Microextraction. In: Paul W, Alan T, Colin P, editors. *Encyclopedia of Analytical Science*. Oxford: Elsevier; 2005. p. 608-16.
108. de Souza Pinheiro A, de Andrade JB. Development, validation and application of a SDME/GC-FID methodology for the multiresidue determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. *Talanta*. 2009;79(5):1354-9.
109. Egea FJ, et al. Estimation and correction of matrix effects in gas chromatographic pesticide multiresidue analytical methods with a nitrogen-phosphorus detector. *Analyst*. 2002;127(8):1038-44.

110. Mahmoud HA, Arief MMH, Nasr IN, Mohammed IH. Residues and half-lives of abamectin, diniconazole and methomyl on and in strawberry under the normal field conditions. *J Appl Sci Res.* 2010;6:932-6.
111. Li S-x, et al. GC-MS determination of multi-pesticide residues. *Lihua Jianyan, Huaxue Fence.* 2008;44:711-4.
112. Wylie PL, Meng C-K. The benefits of incorporating GC/QqQ into pesticide analysis methods. *LC-GC Eur.* 2008:9-11.
113. Savant RH, et al. Multiresidue Analysis of 50 Pesticides in Grape, Pomegranate, and Mango by Gas Chromatography-Ion Trap Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2010:1447-54.
114. Patel K, et al. Evaluation of large volume-difficult matrix introduction-gas chromatography-time of flight-mass spectrometry (LV-DMI-GC-TOF-MS) for the determination of pesticides in fruit-based baby foods. *Food Addit Contam.* 2004;21:658-69.
115. Banerjee K, et al. Optimization of separation and detection conditions for the multiresidue analysis of pesticides in grapes by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 2008;1190(1-2):350-7.
116. Poole CF. *Instrumental Aspects of Gas Chromatography. The Essence of Chromatography.* Amsterdam: Elsevier Science; 2003. p. 171-266.
117. Baldwin MA. Mass Spectrometers for the Analysis of Biomolecules. In: Burlingame AL, editor. *Methods in Enzymology: Academic Press; 2005.* p. 3-48.
118. Standing KG, Ens W. Time of Flight Mass Spectrometers. In: John L, editor. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry.* Oxford: Academic Press; 1999. p. 2851-6.
119. Somogyi Á. Mass spectrometry instrumentation and techniques. In: Károly V, András T, Akos V, editors. *Medical Applications of Mass Spectrometry.* Amsterdam: Elsevier; 2008. p. 93-140.
120. Dawson PH, Douglas DJ. Quadrupoles, Use of in Mass Spectrometry. In: John L, editor. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry.* Oxford: Academic Press; 1999. p. 2315-24.
121. March RE. Ion Trap Mass Spectrometers. In: John L, editor. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry.* Oxford: Academic Press; 2010. p. 1165-73.
122. Davies IW. Chromatography: Gas | Sampling Systems. In: Ian DW, editor. *Encyclopedia of Separation Science.* Oxford: Academic Press; 2000. p. 550-8.
123. Semard G, Adahchour M, Focant J-F. Chapter 2 Basic Instrumentation for GC×GC. In: Lourdes R, editor. *Comprehensive Analytical Chemistry: Elsevier; 2009.* p. 15-48.
124. Lifshitz C, Märk TD. Mass Spectrometry, Ionization Theory. In: John L, editor. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry.* Oxford: Academic Press; 1999. p. 1459-69.

125. Kazakevich YV. 2 HPLC theory. In: Satinder A, Henrik R, editors. *Separation Science and Technology*: Academic Press; 2007. p. 13-44.
126. Haddad PR, Nesterenko PN, Buchberger W. Recent developments and emerging directions in ion chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2008;1184(1-2):456-73.
127. Palamareva MD. Liquid chromatography | Principles. In: Paul W, Alan T, Colin P, editors. *Encyclopedia of Analytical Science*. Oxford: Elsevier; 2005. p. 112-8.
128. Kostanski LK, Keller DM, Hamielec AE. Size-exclusion chromatography--a review of calibration methodologies. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2004;58(2):159-86.
129. Gilby AC. Chromatography: liquid | Detectors: Ultraviolet and Visible Detection. In: Ian DW, editor. *Encyclopedia of Separation Science*. Oxford: Academic Press; 2007. p. 1-15.
130. Scott RPW. Chromatography: liquid | Detectors: Fluorescence Detection. In: Ian DW, editor. *Encyclopedia of Separation Science*. Oxford: Academic Press; 2000. p. 602-8.
131. Mazza C. Light Scattering Detectors. In: Ian DW, editor. *Encyclopedia of Separation Science*. Oxford: Academic Press; 2007. p. 1-8.
132. Vogeser M, Seger C. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory -- Goals for further developments. *Clinical Biochemistry*. 2008;41(9):649-62.
133. Van Baar BLM. Chapter 2. Ionisation Methods in LC-MS and LC-MS-MS (TSP, APCI, ESP and cf-FAB). In: Barceló D, editor. *Journal of Chromatography Library*: Elsevier; 1996. p. 71-133.
134. Tang K, Page JS, Kelly RT, Marginean I. Electrospray Ionization in Mass Spectrometry. In: John L, editor. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. Oxford: Academic Press; 2010. p. 467-74.
135. Reemtsma T. The use of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in water analysis - Part I: Achievements. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2001;20(9):500-17.
136. Taylor LT. Supercritical fluid chromatography for the 21st century. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2009;47(3):566-73.
137. García MA, et al. Chapter 2, Separation modes in capillary electrophoresis. In: M.L. Marina AR, Valcárcel M, editors. *Comprehensive Analytical Chemistry*: Elsevier; 2005. p. 31-134.
138. Twyman RM. Immunoassays | Overview. In: Paul W, Alan T, Colin P, editors. *Encyclopedia of Analytical Science*. Oxford: Elsevier; 2005. p. 299-306.
139. Chu FS. Immunoassays | Radioimmunoassay and Enzyme Immunoassay. In: Benjamin C, editor. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Oxford: Academic Press; 2003. p. 3248-55.
140. Claudio JC, Daniel ELP. Biosensors: implementation and outlook in the control and process quality and foodstuffs. *Vitae*. 2009;16(1):144-154.