

EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS: PRINCIPIOS Y APLICACIONES AL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS

ANTONIO VALVERDE GARCÍA

INTRODUCCIÓN

La alta calidad y el nivel de competitividad de la producción hortofrutícola de la provincia de Almería, al igual que la de otras importantes zonas agrícolas del mundo, tiene como fundamento la utilización de las técnicas más avanzadas, basadas en el cultivo protegido. Una característica de este tipo de cultivos es la de precisar de un control muy estricto ante la eventual aparición de plagas y enfermedades, lo que hace que los productos fitosanitarios, o plaguicidas, sean un elemento imprescindible para la obtención de la producción esperada.

A causa de esta «inevitable» utilización de los plaguicidas, las frutas y hortalizas, y en general cualquier producto agrícola que haya sido tratado, antes de su comercialización, deben ser sometidas a un escrupuloso control que asegure que los residuos presentes en las mismas no superan los límites máximos (LMRs) establecidos en las legislaciones de los países en las que se van a consumir. En otras palabras, las frutas y hortalizas deben ser sometidas a un control de «calidad toxicológica», para el que es preciso disponer de métodos de análisis multiresiduos que permitan extraer, separar, detectar y cuantificar cualquier plaguicida, de una forma rápida y segura.

La mayoría de los métodos multiresiduos que se utilizan en la actualidad han sido desarrollados y/o validados por las agencias oficiales encargadas del control de alimentos de determinados países (Estados Unidos, Canadá, Suecia, Alemania, Holanda, Finlandia, etc.), siendo ésta la razón de que los manuales analíticos publicados por dichas agencias sean la mejor fuente de información para conocer en detalle alguno de estos métodos. Dichos manuales, y las revisiones bibliográficas publicadas sobre el análisis de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas, muestran como el esquema básico de este tipo de análisis no ha sufrido grandes cambios durante las últimas décadas, el cual sigue consistiendo en una etapa de extracción con disolventes orgánicos, una etapa de partición/concentración, una etapa de «clean-up», y una etapa final de determinación de los plaguicidas, que generalmente es llevada a cabo mediante técnicas cromatográficas utilizando diferentes combinaciones columna/detector.

Ciertamente, durante los últimos años, se han producido apreciables mejoras en los métodos de análisis de residuos de plaguicidas, al ir incorporándose en los mismos los avances tecnológicos que se han ido produciendo en los sistemas de separación, detección y tratamiento de datos. Sin embargo, a pesar de que tanto el tiempo como el coste de estos análisis suelen estar limitados por la etapa de extracción, en las últimas décadas no se ha producido, prácticamente, ninguna mejora significativa en dicha etapa, la cual sigue siendo realizada con muestras de gran tamaño (50-100 g) y utilizando grandes volúmenes de disolventes, fundamentalmente acetona, diclorometano, acetonitrilo y acetato de etilo. La consecuencia de este «atraso tecnológico» de la etapa de extracción es que estos análisis siguen siendo caros y menos rápidos de lo deseado, además de llevar implícito un potencial riesgo para la salud y el medio ambiente.

El reciente desarrollo, a escala analítica, de la técnica de «Extracción con Fluidos Supercríticos» (SFE) ha abierto nuevas perspectivas para la mejora de la etapa de preparación de la muestra en cualquier proceso analítico, y su introducción en el análisis de residuos de plaguicidas puede llevar a que definitivamente sean superadas las limitaciones presentadas por los métodos de extracción convencionales.

En esencia, el proceso de extracción con fluidos supercríticos es similar al de una extracción clásica, con la particularidad de utilizar como agente extractor un fluido supercrítico en lugar de un líquido. No obstante, las peculiares propiedades del «estado supercrítico» hacen que las características generales de esta nueva técnica se aproximen a las exigidas a un proceso de extracción ideal, el cual debe ser rápido, simple, barato, no contaminante, selectivo, aplicable a analitos termolábiles y conducir a la obtención de extractos finales listos para el análisis.

El objeto de esta conferencia será el darles a conocer los fundamentos y ventajas de esta «mágica» técnica SFE, así como analizar los resultados obtenidos hasta la fecha sobre su aplicación al análisis de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas.

PROPIEDADES DE LOS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS Y VENTAJAS DE LA TÉCNICA SFE

Antes de pasar a discutir los aspectos prácticos de la técnica SFE, es preciso que comprendamos el porqué de sus magníficas cualidades, para lo cual es imprescindible que tengamos una idea clara sobre lo que es un fluido supercrítico y conozcamos sus principales propiedades fisicoquímicas.

De sobra es conocido que toda sustancia está caracterizada por un diagrama de fases que nos permite conocer el estado de agregación de la misma a cualquier valor de presión y temperatura (Figura 1). Estos diagramas de fases están definidos al menos por tres líneas, la línea de fusión, la de sublimación y la de vaporización, que vienen determinadas por el conjunto de parejas de valores de presión y temperatura a los cuales se produce el correspondiente cambio de estado. La línea de vaporización, al contrario de las otras dos, presenta la particularidad de desaparecer en un punto del diagrama, llamado «punto crítico», a una presión y una temperatura que se denominan, asimismo, «presión crítica» y «temperatura crítica».

La zona de un diagrama de fases en la que tanto los valores de presión como los de temperatura son superiores a los críticos, se caracteriza por el hecho de que la sustancia no puede llegar a licuarse por mucho que aumentemos la presión, así como tampoco es posible su vaporización por mucho que se aumente la temperatura. En esta zona del diagrama la sustancia no puede ser considerada ni como gas ni como líquido y se dice que se encuentra en «estado supercrítico» o, dicho de otra forma, que es un «fluido supercrítico».

Los valores de la presión y temperatura críticas son característicos de cada sustancia, y pueden ser muy diferentes de una a otra (Tabla 1). Algunas sustancias, tales como el dióxido de carbono (CO_2) o el monóxido de dinitrógeno (N_2O), alcanzan el estado supercrítico a temperaturas y presiones relativamente moderadas. Otras, sin embargo, necesitan condiciones de presión y/o temperatura muy drásticas para poder convertirse en fluidos supercríticos, siendo un ejemplo claro de este tipo de sustancias el agua (H_2O) o el amoníaco (NH_3). Lógicamente, la mayor o menor facilidad para alcanzar el estado supercrítico será uno de los factores determinantes a la hora de elegir un compuesto para ser utilizado en SFE. De hecho, el fluido más ampliamente utilizado a escala analítica es el CO_2 , el cual, además de presentar -como veremos más adelante- otras no menos importantes propiedades, adquiere la condición de supercrítico a la temperatura de $31\text{ }^\circ\text{C}$ y a la relativamente moderada presión de 73 atmósferas.

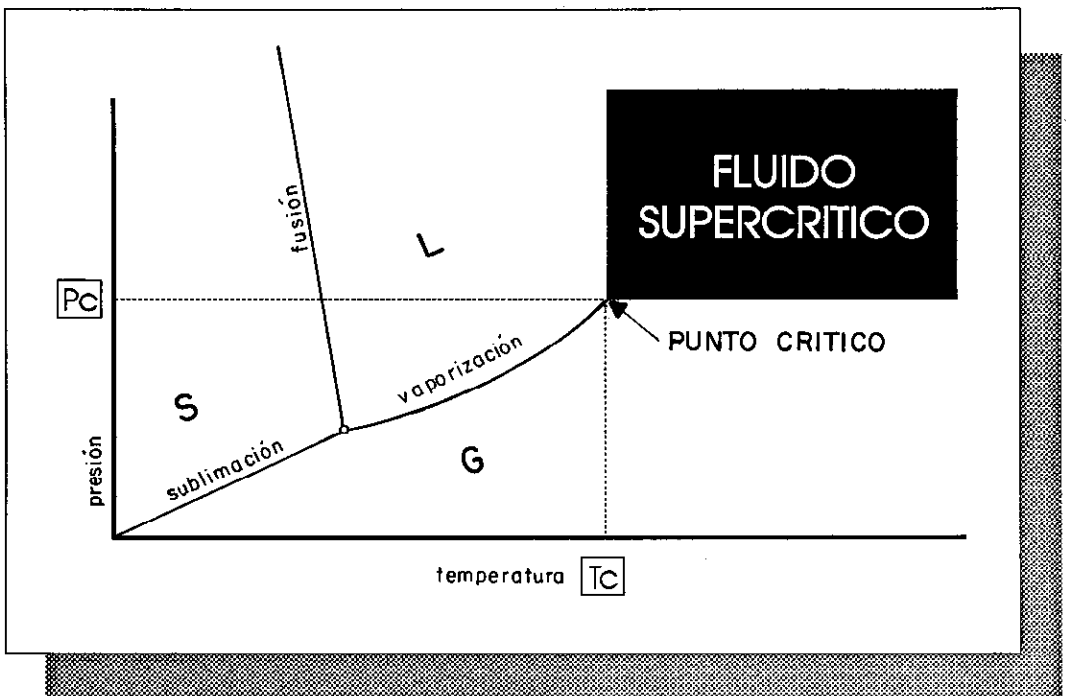


FIGURA 1
Diagrama de Fases.

TABLA 1
**Parámetros críticos del dióxido de carbono,
 monóxido de dinitrógeno, amoníaco, metanol y agua**

Fluido	Temperatura crítica (°C)	Presión crítica (atm)
CO ₂	31	73
N ₂ O	36	72
NH ₃	133	112
MeOH	240	80
H ₂ O	374	217

El gran atractivo que presentan los fluidos supercríticos para ser utilizados como agentes extractores radica en que poseen densidades similares a las de los líquidos, y por tanto similares propiedades disolventes, pero a la vez su viscosidad es mucho menor (entre 5 y 20 veces menor), lo que hace que los coeficientes de difusión de los solutos en un fluido supercrítico sean mucho mayores que en un disolvente líquido (Tabla 2). Así pues, cabe esperar que las extracciones con fluidos supercríticos sean, en primer lugar, tan completas como las llevadas a cabo con disolventes líquidos, debido a que ambos presentan similares características solvatantes, y en segundo lugar, mucho más rápidas y eficientes, ya que su baja viscosidad favorece los fenómenos de transferencia de masa (transporte de los analitos) y la penetrabilidad en los poros de la matriz de la muestra.

Otra importante propiedad de los fluidos supercríticos es que, contrariamente a lo que ocurre con los líquidos, su densidad está estrechamente relacionada con la presión y, en una menor medida, con la temperatura. A temperatura constante, la densidad de un fluido supercrítico aumenta notablemente al aumentar la presión, mientras que a presión constante la densidad disminuye al aumentar la temperatura. Por ejemplo, a la temperatura de 40 °C, la densidad del CO₂ supercrítico pasa de 0,25 g/mL a 0,92 g/mL cuando la presión aumenta de 80 atm a 300 atm; mientras que a esta última presión, la densidad disminuye desde 0,92 mg/mL hasta 0,67 mg/mL al aumentar la temperatura de 40 °C a 100 °C. Esta propiedad, unida al hecho de que el poder disolvente de un fluido supercrítico es directamente proporcional a su densidad, hacen posible el que la capacidad de solvatación de un determinado fluido supercrítico sobre un analito pueda ser fácilmente modificada mediante un cambio de presión y/o temperatura. Esto significa que en SFE existe la posibilidad de llevar a cabo la extracción selectiva de diferentes tipos de analitos variando la densidad del fluido, lo cual puede conseguirse con un simple cambio de la presión de extracción.

Para ver de una forma más clara las ventajas que la técnica SFE tiene sobre las extracciones convencionales, sería de gran ayuda conocer con cierto detalle algunos de los modelos teóricos desarrollados para predecir y comparar el poder disolvente de una sustancia. Esto, sin duda, se sale de

TABLA 2
Valores típicos de densidad, viscosidad y difusividad
para gases, fluidos supercríticos y líquidos

Fluido	Densidad (g/mL)	Viscosidad (Pa.s)	Difusividad (cm ² /s)
Gases	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻¹
F. Supercríticos	0,2-0,9	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
Líquidos	0,6-1,6	10 ⁻³	10 ⁻⁵

los límites de esta conferencia. No obstante, comentaremos que uno de estos modelos establece el poder disolvente en términos de un parámetro, denominado parámetro de solubilidad de Hildebrand, que puede determinarse empíricamente para cualquier sustancia. En general, cuanto mayor es este parámetro mejores son las propiedades como disolvente de una sustancia, siendo los compuestos polares los que presentan valores mas altos del mismo. Para los fluidos supercríticos este parámetro puede ser calculado a partir de la siguiente relación empírica (Giddings J.C. et al., Science, 1968, 162, 67):

$$\delta = 1,25 P_c^{1/2} (\rho_f/\rho_l)$$

siendo d el parámetro de solubilidad de Hildebrand, P_c la presión crítica, r_f la densidad del fluido supercrítico, y r_l la densidad del fluido en estado líquido. Esta relación nos indica que el poder disolvente de un fluido supercrítico depende de dos efectos diferentes. El primero es un efecto químico, semejante al que se da en los disolventes líquidos, definido por $1,25 P_c^{1/2}$ (éste es el máximo valor que puede tomar d y corresponde al de la sustancia en estado líquido, $r_f/r_l = 1$). El segundo es un efecto de estado, representado en la ecuación por r_f/r_l , que depende de la densidad del fluido y por tanto de la presión y la temperatura. Como puede observarse, el poder disolvente de un fluido supercrítico es directamente proporcional a su densidad, y varía con la presión y la temperatura en la misma extensión que ésta. Esto contrasta marcadamente con el comportamiento de los disolventes líquidos, para los que el parámetro de solubilidad, y por tanto su poder disolvente, permanece prácticamente invariable con los cambios de presión y temperatura.

Dióxido de Carbono Supercrítico

Otra ventaja adicional de la técnica SFE se produce cuando el fluido utilizado tiene la propiedad de ser gas a presión atmosférica (CO₂, N₂O, etc). En estos casos el agente extractor puede dejarse escapar a la atmósfera tras la etapa de extracción, pudiéndose recoger los analitos en un pequeño volumen de disolvente. Esto permite llevar a cabo las extracciones sin utilizar prácticamente disolventes orgánicos, y obtener extractos finales listos para ser analizados sin necesidad de efectuar posteriores etapas de concentración.

El dióxido de carbono, además de ser gas a presión atmosférica, presenta otras importantes ventajas prácticas que han hecho que sea, con diferencia, el fluido más utilizado en las aplicaciones hasta ahora descritas de la técnica SFE. De entre ellas pueden destacarse las siguientes: es inerte, no tóxico, barato, puede adquirirse con un alto grado de pureza y, tal como ya se ha comentado, adquiere el estado supercrítico a baja temperatura (31 °C) y a una presión de fácil manejo (73 atm). Realmente, la única desventaja que presenta el CO₂ frente a otros fluidos supercríticos es su carácter apolar, lo que hace que pueda no ser adecuado para extraer analitos de elevada polaridad. Para la extracción de este tipo de compuestos podrían utilizarse otros fluidos polares, tales como amoníaco o metanol; sin embargo, éstos presentan grandes inconvenientes, como por ejemplo ser químicamente reactivo y tóxico en el caso del amoníaco, o presentar una elevada temperatura crítica y ser líquido a temperatura ambiente en el caso del metanol.

Fluidos Supercríticos Modificados

En la práctica, esta limitación de los fluidos supercríticos no polares es usualmente superada mediante la adición a éstos de pequeñas cantidades de un disolvente orgánico polar, que recibe el nombre de «modificador» o co-disolvente. Así, es muy común utilizar dióxido de carbono modificado con pequeñas cantidades de metanol para conseguir que las extracciones de analitos polares lleguen a ser completas.

Hay dos razones fundamentales que justifican la acción del modificador. La primera está relacionada con los cambios que se producen en las propiedades del fluido supercrítico modificado, el cual tendrá diferentes parámetros críticos y presentará cierta polaridad, por lo que será mayor su poder disolvente. La segunda, y quizás más importante, está relacionada con los efectos que el modificador puede ejercer sobre la matriz de la muestra, pudiendo destacarse el de favorecer la desorción de los analitos adsorbidos en los centros activos de la matriz.

EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCÁRITICOS

Instrumentación

La instrumentación necesaria para realizar una extracción con fluidos supercríticos es, en principio, bastante simple (Figura 2). Básicamente, el sistema de extracción consiste en una bomba de alta presión, una celda de extracción, una zona en la que se produce la descompresión del fluido, y por último un sistema adecuado de colección de los analitos. En general, los sistemas comerciales están constituidos por bombas que permiten trabajar a presiones comprendidas entre 100 y 700 atm, siendo capaces de suministrar el fluido a presión y flujo constantes, y de mantener la presión seleccionada a lo largo de todo el sistema de extracción. El extractor propiamente dicho consta de una o varias celdas de extracción, donde se sitúa la muestra, y de un sistema adecuado que permite fijar y mantener la temperatura del fluido durante toda la etapa de extracción. Las temperaturas usuales de trabajo oscilan entre 30 y 150 °C. El tamaño de las

celdas de extracción puede variar ampliamente, aunque los volúmenes típicos de las mismas oscilan entre 0,5 y 10 mL, por lo que el tamaño de la muestra en SFE suele ser considerablemente menor que los empleados en las extracciones convencionales de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas.

La parte del equipo donde se produce la descompresión del fluido (restricor) suele consistir en un simple tubo capilar de pequeño diámetro interno, metálico o de sílice fundida (restricor fijo), o bien en una serie de válvulas micrométricas que permiten controlar de forma mecánica el diámetro del orificio de salida del restricor (restricor variable). La temperatura de la zona del restricor también suele estar termostatzada con el fin de evitar que los analitos extraídos precipiten dentro de él y lo obsturen, ya que cuando se utilizan fluidos que son gases a presión ambiente (que es lo más usual), la expansión de éstos durante el proceso de descompresión produce un fuerte enfriamiento.

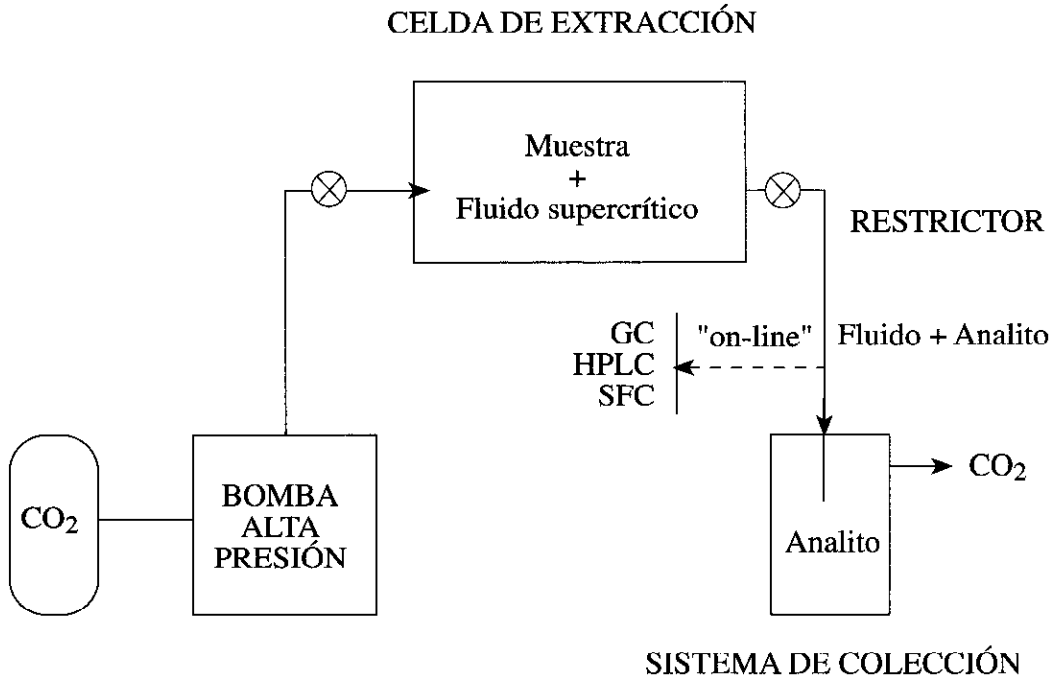


FIGURA 2
Esquema SFE.

El diseño del sistema utilizado para recoger los analitos es un factor decisivo para conseguir que las extracciones sean efectivas. Este puede consistir en un simple vial o tubo de ensayo conteniendo un pequeño volumen de disolvente orgánico, en el que se hace burbujear el fluido a la salida del restrictor, o en sistemas más complejos, como aquellos que utilizan cartuchos de un material adsorbente enfriados criogénicamente. Una vez finalizado el proceso de extracción, los extractos obtenidos pueden pasar a ser analizados en el correspondiente sistema cromatográfico sin necesidad de realizar posteriores etapas de concentración (Off-line SFE).

En SFE también existe la posibilidad de acoplar directamente el equipo de extracción al equipo cromatográfico utilizado para el análisis (On-line SFE). En este caso, los analitos extraídos son transferidos y recogidos en el «loop» de inyección, en una trampa térmica o adsorbente situada antes de la columna, o incluso en la misma fase estacionaria en la cabeza de la columna. En bibliografía pueden encontrarse descritas distintas aplicaciones de la técnica SFE acoplada «on-line» a cromatografía de gases (GC), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y cromatografía de fluidos supercríticos (SFC). Esta posibilidad de acoplamiento «on-line» representa, sin duda, otra ventaja de la técnica SFE frente a las extracciones convencionales, ya que permite una fácil automatización del proceso analítico completo. Además, el acoplamiento «on-line» es inherentemente más sensible, ya que todo el analito extraído es introducido en el sistema cromatográfico. No obstante, a pesar de estas ventajas del acoplamiento «on-line», la aplicación de la técnica SFE al análisis de residuos de plaguicidas, en la mayoría de las ocasiones, se realizará en la forma «off-line», ya que en este tipo de análisis, normalmente, interesa analizar el extracto final en diferentes técnicas y/o parámetros cromatográficos, para lo que es necesario mantener separados los sistemas de extracción y de determinación.

Tipos de extracción

La extracción con fluidos supercríticos, al igual que las extracciones con disolventes líquidos, puede llevarse a cabo de forma estática o de forma dinámica. En la forma estática, la celda de extracción es presurizada con el fluido manteniendo cerrada la válvula de salida del extractor. Una vez finalizada la extracción, dicha válvula es abierta, pasando el fluido con los analitos extraídos al sistema de colección. En el modelo dinámico, el fluido en estado supercrítico se deja fluir de forma continua a través de la celda de extracción, manteniendo las válvulas de entrada y de salida del extractor abiertas durante todo el período de extracción. En este caso el flujo del fluido a través del sistema de extracción viene fijado, fundamentalmente, por la presión de trabajo y por las características del restrictor (longitud y diámetro interno en el caso de los restrictores fijos).

En principio, cabe pensar que la extracción dinámica dé mejores y más rápidas recuperaciones, ya que con esta forma de operación, durante todo el proceso de extracción, se produce la continua renovación del fluido que entra en contacto con la muestra, lo que hace que sea difícil que el fluido pueda llegar a saturarse. No obstante, el modelo estático permite una mayor penetración del fluido en los poros de la matriz de la muestra, así como el que se pueda alcanzar el equilibrio de reparto del analito entre la matriz y el fluido. Esta es la razón de que, en la práctica, las extracciones suelen llevarse a cabo realizando una extracción estática, a la que sigue un período de extracción dinámica (extracción estática/dinámica).

Anteriormente se ha mencionado que en determinadas aplicaciones puede ser necesario la utilización de fluidos supercríticos modificados. En estos casos, la forma de adicionar el modificador también puede ser realizada de formas diferentes. La forma más sencilla consiste en añadir el modificador directamente a la muestra inmediatamente antes de proceder a la extracción (adición estática). La otra posibilidad es utilizar un fluido previamente modificado (adición dinámica), el cual puede adquirirse en el mercado ya preparado, o bien puede prepararse «in situ», antes de iniciar la extracción, utilizando una segunda bomba de presión. Esta última forma de adicionar el modificador presenta la ventaja de permitir trabajar con una gran variedad de modificadores y la posibilidad de controlar la composición de la mezcla fluido/modificador.

Variables SFE

Cuando se quiere desarrollar un método SFE, además de seleccionar el agente extractor (fluido supercrítico) adecuado para una determinada combinación analito/matriz, es necesario optimizar las diferentes variables que influyen en el proceso de extracción y en el de colección de los analitos. Las principales variables a tener en cuenta son: densidad del fluido (presión y/o temperatura), tipo de extracción (dinámica, estática), volumen y velocidad del fluido o tiempo de extracción, modificador (tipo y forma de adición), características de la muestra (tamaño de partícula, grado de humedad, etc.), tipo de restrictor, y sistema de colección (tipo y volumen de disolvente o material adsorbente y disolvente de elución, temperatura, etc.).

Tradicionalmente, la elección de las condiciones de extracción ha estado condicionada por la presión y la temperatura a la cual el analito presentaba un valor máximo de solubilidad en el fluido supercrítico utilizado. Sin embargo, tanto los modelos teóricos desarrollados para explicar el proceso SFE a escala analítica, como muchos de los estudios experimentales que se han realizado, han puesto de manifiesto que las limitaciones que presenta esta técnica para ser aplicada a algunos analitos/matrices (fundamentalmente analitos polares en matrices polares) están determinadas, no por problemas de solubilidad del analito en el fluido supercrítico, sino más bien por consideraciones de tipo cinético, determinadas a su vez por la forma en la que el analito se encuentra inicialmente distribuido en la matriz de la muestra, y por la eficacia del fluido supercrítico para competir con el analito por los centros de adsorción de la misma. Esto ha llevado a que gran parte de las investigaciones que se realizan en la actualidad para llegar a introducir la técnica SFE en el análisis de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas, presten una especial atención a variables tales como tratamiento de la muestra antes de proceder a la extracción, utilización de modificadores y temperatura, en base a su influencia sobre la cinética del proceso de extracción.

APLICACIONES DE LA TÉCNICA SFE AL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN FRUTAS Y HORTALIZAS

Las primeras aplicaciones de la técnica de extracción con fluidos supercríticos se produjeron en el campo industrial a finales de los años setenta. En 1978 ya existía en Alemania una

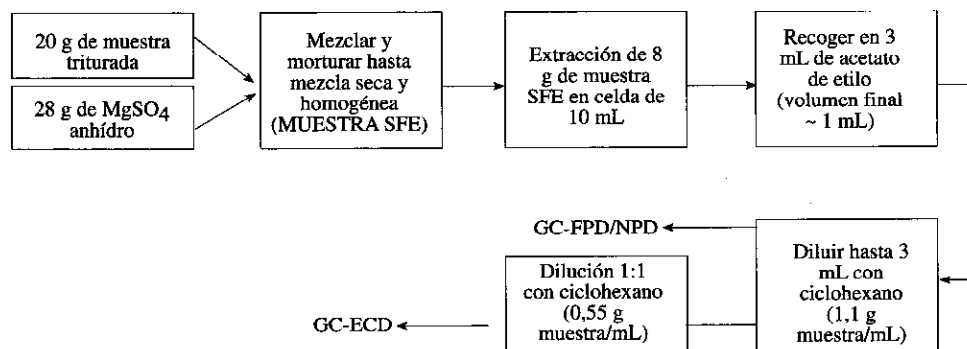
planta industrial para la producción de café descafeinado, que utilizaba dióxido de carbono supercrítico para la extracción de la cafeína. Así pues, la novedad de esta técnica no radica en el propio desarrollo de misma, sino más bien en su aplicación a escala analítica, la cual empezó a adquirir importancia durante la segunda mitad de la pasada década.

Sin duda, el análisis de plaguicidas ha sido una de las áreas donde la técnica SFE ha despertado un mayor interés. Las particulares propiedades de los fluidos supercríticos -en especial las del CO₂ supercrítico- ya han sido aprovechadas para llevar a cabo la extracción de ciertos plaguicidas de suelos y otras matrices sólidas con bajos contenidos en agua, habiéndose conseguido que estos análisis sean rápidos y sencillos, baratos, con escaso impacto medioambiental, y con grandes posibilidades de automatización y miniaturización. Sin embargo, estas ventajas inherentes a la técnica SFE han sido escasamente aprovechadas en el análisis de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas, debido a las limitaciones que presenta la misma para ser aplicada a muestras con elevados contenidos en agua y a analitos de elevada polaridad (como algunos de los plaguicidas de mayor uso en la actualidad).

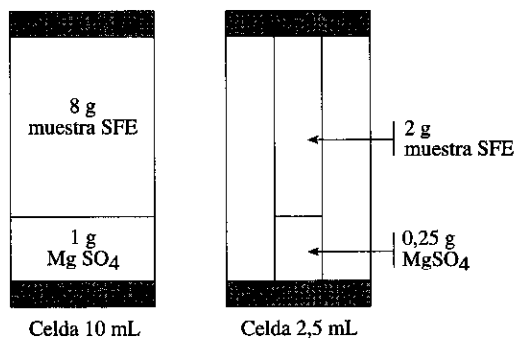
Muy recientemente, dichas limitaciones han sido parcialmente superadas por Hopper y King, en la «Food and Drug Administration» (FDA) de Estados Unidos, y por Lehotay y Eller, en el Departamento de Agricultura también de Estados Unidos. Estos investigadores han conseguido aplicar con éxito la técnica SFE al análisis de diferentes plaguicidas en muestras de patata, uva, zanahoria, brécol y lechuga, utilizando un material denominado Hydromatrix (65% tierras de diatomeas, 35% sílice cristalina) para preparar las muestras antes de la extracción. No obstante, en ambos casos, el método propuesto no fué adecuado para la extracción de algunos plaguicidas polares, como ometoato o metamidofos.

En este punto es preciso que me refiera con algo más de detalle al proyecto de investigación que el grupo de investigación «Residuos de Plaguicidas» de la Universidad de Almería está desarrollando sobre la aplicación de la técnica SFE al análisis de residuos de plaguicidas en hortalizas (proyecto financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, CICYT: ALI93-0589). Los estudios hasta ahora realizados nos han llevado a proponer un método SFE, utilizando sulfato de magnesio anhidro en la etapa de preparación de la muestra, que ha mostrado ser eficaz para la extracción de plaguicidas polares y no polares de diferentes hortalizas. Tanto el método desarrollado como los resultados obtenidos en las primeras aplicaciones del mismo fueron dados a conocer el pasado mes de Julio en el «8th IUPAC Congress on Pesticide Chemistry» celebrado en la ciudad de Washington. A continuación expondré un resumen de dichos resultados.

En la Figura 3 aparece un esquema del método SFE propuesto. La aplicación del mismo a muestras de pimiento, pepino y tomate, fortificadas con metamidofos, metiocarb, clorpirifos, clortalonil y endosulfan, condujo a la obtención de recuperaciones superiores al 80 % en todos los casos. Especialmente destacables son las recuperaciones obtenidas para metamidofos (Figura 4), ya que éste es uno de los plaguicidas más polares que existen, con un valor de solubilidad en agua del orden de 2 kg/kg y que, tal como ya se ha comentado, hasta ahora no había podido ser analizado mediante la aplicación de la técnica SFE.



PREPARACIÓN DE LA CELDA



CONDICIONES DE EXTRACCIÓN



FIGURA 3
Método propuesto (CICYT: ALI 93-0589).

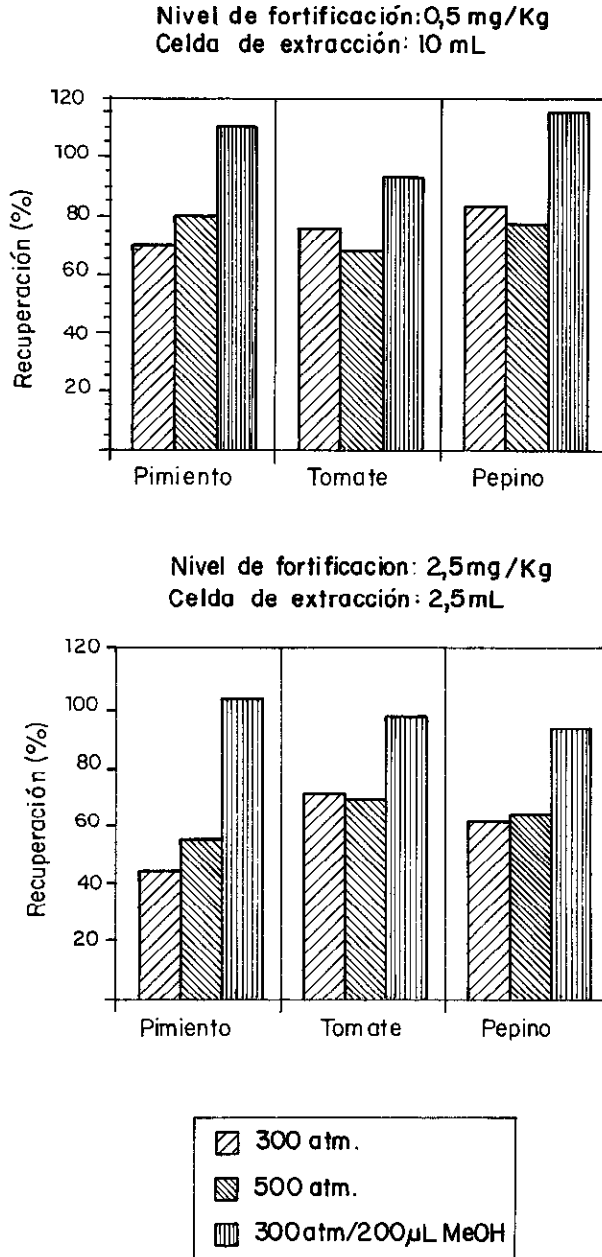


FIGURA 4

Extracción de muestras de hortalizas fortificadas con Metamidofos. Condiciones SFE:

Temperatura, 50°C; Volumen CO₂, 15 mL.

(Valverde García A. et al., J. AOAC Int. 78, 867-873, 1995)

Estos resultados, a pesar de ser excelentes, no son del todo concluyentes sobre la aplicabilidad del método, ya que un gran número de trabajos sobre la aplicación a escala analítica de la técnica SFE han mostrado que las recuperaciones obtenidas sobre muestras fortificadas son, en general, mayores que las obtenidas sobre muestras reales, en las cuales el analito puede estar mucho más fuertemente unido a la matriz de la muestra. Por tanto, el método propuesto fué ensayado sobre muestras reales en las que previamente se habían determinado residuos de metamidofos y otros plaguicidas. La mayor parte de estas muestras procedieron del programa de control de residuos (1993) de la Asociación de Productores-Exportadores de Productos Hortofrutícolas de Almería (COEXPHAL), cuyo laboratorio participa al 50% en este proyecto de investigación. En total fueron sometidas a análisis SFE 31 de estas muestras, en las que se habían determinado niveles de metamidofos entre 1,59 y 0,08 mg/kg (utilizando las técnicas convencionales de análisis). El grado de recuperación medio obtenido para metamidofos en estas muestras reales («incurred samples») fué del 113% con un coeficiente de variación del 26%.

Una de las muestras del programa de control de Coexphal, en la que se habían determinado residuos de metamidofos (0,53 mg/kg) y endosulfan (0,09 mg/kg), fué analizada mediante el método SFE propuesto, por triplicado y realizando dos réplicas de cada extracción. Los resultados de estos análisis (Tabla 3) confirmaron que, cuando las muestras de hortalizas son previamente mezcladas con sulfato de magnesio, los residuos de plaguicidas de polaridad tan diferente como metamidofos y endosulfan pueden ser eficientemente extraídos utilizando la técnica SFE.

TABLA 3

Niveles de Metamidofos y Endosulfan determinados mediante SFE* en una muestra real de pimiento del programa de control de Coexphal (1993), en la que previamente se estableció que contenía 0,53 mg/kg de Metamidofos y 0,09 mg/kg de Endosulfan mediante análisis convencional. (Valverde García A. et al., J. AOAC Int. 78, 867-873, 1995)

Muestra SFE	Extracción	Metamidofos, mg/kg		Endosulfan, mg/kg	
		300 atm	500 atm	300 atm	500 atm
A	A ₁	0,66	0,63	0,16	0,18
	A ₂	0,79	0,66	0,15	0,14
B	B ₁	0,73	0,56	0,09	0,14
	B ₂	0,81	0,92	0,15	0,13
C	C ₁	0,56		0,08	
	C ₂	0,80		0,10	
Media		0,73	0,69	0,12	0,15
c.v. %		14	23	29	15

* Extracción dinámica (1 min estática), a la presión indicada y 50 °C, con 15 mL de CO₂ y 200 µL de metanol como modificador estático.

El método de preparación de la muestra, las condiciones de extracción y el sistema de colección utilizados en la metodología SFE desarrollada son sencillos, baratos, y conducen, además, a la obtención de extractos finales listos para ser analizados mediante cualquier técnica cromatográfica, sin necesidad de realizar una etapa adicional clean-up (incluso cuando se utiliza detector de captura de electrones). Esto, unido a los excelentes resultados obtenidos sobre muestras de hortalizas reales, nos induce a pensar que la técnica SFE puede llegar a convertirse, en un futuro no muy lejano, en una de las técnicas preferidas para realizar los análisis rutinarios de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas.

Antes de finalizar, debo mencionar que estas investigaciones sobre la aplicación de la técnica SFE al análisis de residuos de plaguicidas en hortalizas fueron iniciadas en el transcurso de una estancia realizada el pasado año en la «National Food Administration» de Suecia, durante la cual recibí el apoyo de todo el personal de dicho organismo, en especial el de Arne Andersson y Birgit Olhin, a quienes quiero expresar aquí mi más profundo agradecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Hawthorne S.B.** «Analytical-Scale Supercritical Fluid Extraction», *Anal. Chem.* **62**, 633A-642A, 1990.
- Hopper M.L. and King J.W.** «Enhanced Supercritical Fluid Carbon Dioxide Extraction of Pesticides from Foods Using Pelletized Diatomaceous Earth», *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **74**, 661-666, 1991.
- King J.W. and Hopper M.L.** «Analytical Supercritical Fluid Extraction: Current Trends and Future Vistas», *J. AOAC Int.* **75**, 375-378, 1992.
- Lehotay S.J. and Eller K.I.** «Development of a Supercritical Fluid Extraction and Gas Chromatography/Ion Trap Mass Spectrometry Method of Analysis for 46 Pesticides in Fruits and Vegetables», *J. AOAC Int.* **78**, 821-830, 1995.
- Luque de Castro M.D., Valcárcel M. y Tena M.T.** «Extracción con Fluidos Supercríticos en el Proceso Analítico», Reverté, Barcelona, 1993.
- Richter B.E.** «Supercritical Fluid Extraction Methods» in *Emerging Strategies for Pesticide Analysis*, T. Cairns and J. Sherma (Eds), CRC Press, Boca Raton, pp. 51-68, 1992.
- Valverde García A., Fernández-Alba A.R., Agüera A. and Contreras M.** «Extraction of Methamidophos Residues from Vegetables with Supercritical Fluid Carbon Dioxide», *J. AOAC Int.* **78**, 867-873, 1995.
- Wenclawiak B.** «Analysis with Supercritical Fluid: Extraction and Chromatography». Springer-Verlag, Reidelberg, 1992.
- Westwood S.A.** «Supercritical Fluid Extraction and its Use in Chromatographic Sample Preparation». CRC Press, Inc., Florida, 1993.