

Metodología para la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en leche de consumo nacional mediante cromatografía de gases y extracción en fase sólida

*Eric Romero Blanco*¹
*Humberto Meza Núñez*²
*Vanessa Poveda Calvo*³

Palabras clave

Cromatografía de gases, plaguicidas organofosforados, leche, extracción en fase sólida.

Resumen

Se desarrolló un nuevo método orientado a la detección y cuantificación de 15 plaguicidas organofosforados en muestras de leche cruda para consumo nacional. Se utilizó un cromatógrafo de gases equipado con columna capilar de polidimetilsiloxano y detector NPD, en combinación con la técnica de extracción en fase sólida (SPE) para el proceso de limpieza de la muestra y extracción de los plaguicidas. Se

obtuvieron porcentajes de recuperación cercanos al 100% y límites de detección inferiores a 20 µg/L para 13 de los organofosforados analizados. El método en general presentó importantes ventajas en comparación con metodologías convencionales de extracción líquido-líquido.

Introducción

Las causas principales de la presencia de residuos de plaguicidas organofosforados (OF) en leche son sus propiedades fisicoquímicas particulares de liposolubilidad. En adición se debe mencionar el uso excesivo y poco regulado de estos compuestos en las prácticas agropecuarias para el control

-
- 1 Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Química. Laboratorio de Servicios Químicos y Microbiológicos CEQIATEC. Tel. 550-2368. Correo electrónico: eromero@costarricense.cr.
 - 2 Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Química. Laboratorio de Servicios Químicos y Microbiológicos CEQIATEC. Tel. 550-2368. Correo electrónico: hmeza@itcr.ac.cr
 - 3 Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Biología. Tel. 550-2285. Correo electrónico: vpoveda@itcr.ac.cr.

de las enfermedades de los animales, transmitidas por insectos y parásitos. Se comprueba que los animales productores de leche expuestos a tales condiciones son capaces de trasladar a su proceso metabólico una carga importante de contaminación por plaguicidas y ser acumulada en lípidos y lipoproteínas. Debido al porcentaje de lípidos presentes en la leche, esta se convierte en un medio en el cual es de esperar la presencia de residuos de plaguicidas organofosforados o de algún metabolito de biotransformación de este. La toxicidad de estos compuestos, la cual se sitúa desde aguda a crónica, aun en pequeñas cantidades, ha sido confirmada por diferentes estudios.

Esta problemática determina la clara necesidad de establecer mecanismos de control y monitoreo en lo referente a la contaminación por plaguicidas organofosforados presentes en la leche destinada al consumo humano. La necesidad de contar con metodologías de análisis químico que permitan detectar la presencia de estos contaminantes, es parte fundamental de estos mecanismos.

Al considerar los bajos niveles que caracterizan las concentraciones máximas permitidas reportadas para plaguicidas organofosforados en leche, se debe recalcar que las metodologías de análisis químico orientadas a la detección y cuantificación de estos plaguicidas deben ser capaces de brindar altos porcentajes de recuperación y bajos límites de detección. Ha sido de uso generalizado paralelo al empleo de la cromatografía de gases, utilizar procedimientos basados en técnicas de extracción líquido-líquido en varias etapas como forma de extracción de los plaguicidas de la leche. Sin embargo, estos están caracterizados por requerir cantidades importantes de disolventes, logrando alcanzar en la mayoría de los casos porcentajes

apenas aceptables de recuperación y un efecto negativo en los límites de detección obtenidos.

Presentamos en este trabajo el desarrollado e implementación de un procedimiento que permite de manera eficiente la detección y cuantificación de plaguicidas organofosforados en leche. El procedimiento utiliza la cromatografía de gases y el proceso de extracción del plaguicida se basa en la técnica de extracción en fase sólida (SPE) como alternativa al método tradicional de extracción líquido-líquido.

Materiales y equipo

Plaguicidas organofosforados

Fueron utilizados estándares sólidos certificados obtenidos de Supelco® para los 15 plaguicidas organofosforados analizados: clorpirifos, clorpirifos metil, coumafos, diazinon, diclorvos, dimetotato, disulfoton, etion, fenamifos, forato, isofenfos, malation, metil paration, paration y terbufos.

Reactivos

Disolventes calidad análisis de residuos: Acetonitrilo (JTBaker®), Acetona (JTBaker®), Hexano (OmniSolv®), Tolueno (Merck®), Etanol absoluto (Merck®), Cloruro de sodio (Merck®), Sulfato de sodio anhidro (Merck®). Agua destilada/desionizada. Cartuchos de extracción en fase sólida para limpieza de la muestra y extracción de los plaguicidas: ENVI-8 (Supelco®), LC-18 (Supelco®), LC-NH2 (Supelco®).

Equipo

El proceso de extracción y concentración se realizó utilizando un Sistema múltiple de vacío VisiTrap (Supelco®) y Rotavapor (Buchi®), con sistema de vacío y temperatura controlada. El análisis cromatográfico se realizó en un

Cromatógrafo de gases Perkin Elmer Auto System, equipado con detector NPD, columna PE-1 (polidimetilsiloxano) de 25 m de largo, 0,33 mm de diámetro interno y 0.25 μm grosor de película.

Procedimiento

Extracción de plaguicidas

Cada muestra de 25 mL de leche se extrajo con 50 mL de acetonitrilo/5 g NaCl, empleando agitación magnética por un período de 10 minutos. La mezcla de extracción se centrifugó por 15 minutos a 4000 rpm. Se procedió a limpiar el extracto orgánico de acetonitrilo empleando cartuchos LC-18 y secarlo sobre sulfato de sodio anhidro. Seguidamente, 5 mL del extracto se diluyeron con agua destilada a un volumen final de 50 mL. Los plaguicidas organofosforados se atraparon pasando el extracto acuoso a través de un cartucho ENVI-8. Los plaguicidas fueron eluidos con 3 mL de hexano-acetona (90:10) y 3 mL de acetona-tolueno (75:25), acoplado la salida del cartucho ENVI-8 un cartucho de limpieza LC-NH2. Posteriormente, el eluato se concentró utilizando un sistema Rotavapor a 35-40 °C hasta un volumen final de 1 mL para ser inyectado al cromatógrafo.

Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico de los extractos se realizó en las siguientes condiciones: temperatura del detector: 300 °C, temperatura del inyector: 250 °C, volumen de inyección: 1 μL , gas de arrastre: helio, *split-less* (1 min), programación del horno: 80 °C (1 min), 15 °C/min, 160 °C (5 min), 15 °C/min, 275 °C (5 min).

Validación del método

Para determinar la competencia técnica del método se evaluaron para cada uno de los plaguicidas organofosforados analizados los parámetros de mérito:

límite de detección y porcentaje de recuperación del proceso de extracción.

Resultados y conclusiones

El método desarrollado en nuestro laboratorio permite de manera eficiente el análisis de la mayoría de los plaguicidas organofosforados más comunes utilizados en la actividad agropecuaria en nuestro país. Es apto para el análisis en serie de números grandes de muestras. La metodología propuesta, en comparación con métodos convencionales de extracción líquido-líquido, se caracteriza por requerir una menor cantidad de muestra, un menor consumo de disolventes orgánicos, y brindar una mejora significativa en porcentajes de recuperación y límites de detección.

Para muestras de leche que contenían concentraciones iniciales de alrededor de 100 $\mu\text{g/L}$, se obtuvieron para 13 de los 15 plaguicidas analizados, excelentes porcentajes de recuperación que se sitúan entre el 105% para el caso de forato y 154% para el malation. Para el caso del diclorvos, se obtuvo un rendimiento del 32% por razones aún no confirmadas al momento de esta publicación; sin embargo, podría estar relacionado con la alta polaridad que presenta la molécula de este plaguicida (i.e., alta solubilidad en agua). Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio, indican que es de esperar, que porcentajes de recuperación similares sean obtenidos para el análisis de los plaguicidas incluidos en este trabajo, en caso de estar presentes en muestras de leche contaminadas con concentraciones aún menores que los 100 $\mu\text{g/L}$.

Por otro lado, para los límites de detección se obtuvieron resultados que se sitúan entre 2 $\mu\text{g/L}$ para el caso del diclorvos y un máximo de 17 $\mu\text{g/L}$ para el coumafos.

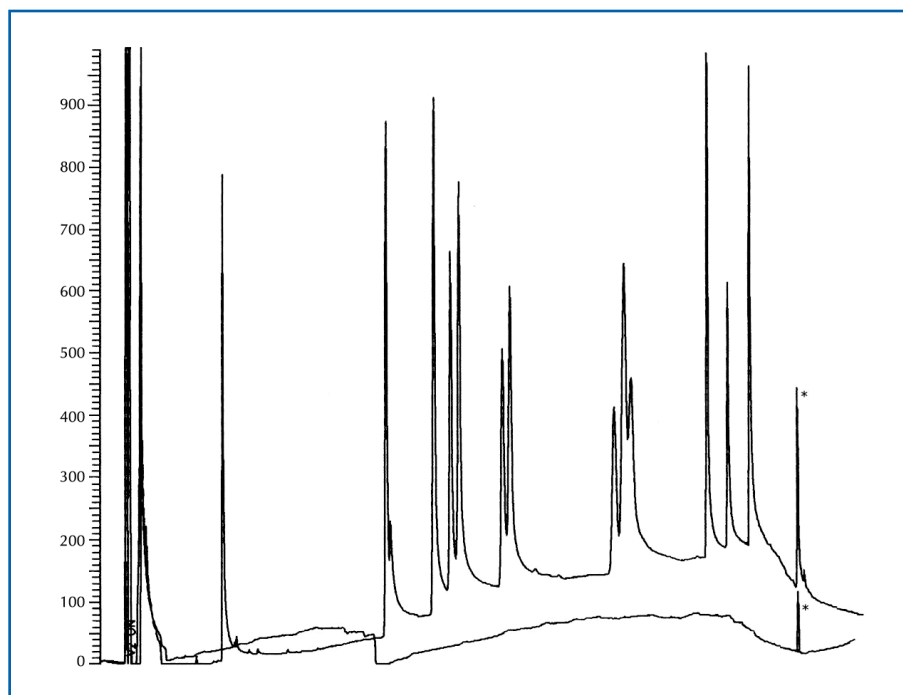


Figura N.º 1. Análisis mediante CLAR de extracto de corteza de raíz de *Uncaria tomentosa* (simplex N.º 13).

Un análisis comparativo entre los resultados de porcentajes de recuperación y límites de detección alcanzados, con los límites máximos permitidos reportados en la literatura (ej. *Codex alimentarius*), permite concluir que el método de análisis desarrollado, puede ser utilizado como mecanismo de monitoreo y control de la contaminación por plaguicidas organofosforados presentes en leche destinada al consumo humano

Bibliografía

Center for Drug Evaluation and Research (CDER) *Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods*. 1994.

Codex alimentarius. *Residuos de plaguicidas en los alimentos: Límites máximos de*

residuos. Junio 2004, www.faostat.fao.org.

Díaz, O. y García, M. *Avances en Toxicología de Contaminantes Químicos en Alimentos 2003*, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) y Universidad de la Frontera, Santiago, Chile.

EURACHEM. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 1998.

García, J. *Introducción a los Plaguicidas 2000*, Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica.

Horwitz, W. *J. Analytical Chemistry* 1982, 54, 67A.

IUPAC. *Pure Appl. Chem.* 1999, 71, 337.

Supelco "Guide to Solid Phase Extraction" 1998, *Bulletin* 910.