

VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA MULTIRRESIDUO PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN FRESA (*Fragraria spp.*) POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

Mauricio Montaña Garcés, Jairo Arturo Guerrero Dallos¹

Recibido: junio de 2001 – Aceptado: noviembre de 2001

Palabras clave: plaguicidas, fresa, método multiresiduo, cromatografía de gases, cromatografía de permeación en geles.

Keywords: pesticides, strawberry, multiresidue, validation, gas chromatography, gel permeation chromatography.

RESUMEN

En este estudio se describe la validación de una metodología analítica multiresiduo para la determinación simultánea de 19 compuestos organoclorados, organofosforados y organonitrogenados en fresa. Los plaguicidas se extrajeron con acetato de etilo, los extractos se limpiaron por cromatografía de permeación por geles (GPC), el análisis se llevó a cabo por cromatografía de gases de alta resolución (CGAR) con inyección en modo *splitless* pulsado y detección simultánea por microcaptura electrónica (μ -ECD) y nitrógeno-fósforo (NPD) acoplados en paralelo.

La metodología es específica, selectiva, precisa y robusta. Las curvas de calibración en extracto de matriz fortificado son lineales en un rango de concentración

de 0.04-5.00 mg/kg, con cantidad mínima detectable (CMD) entre 0.007-0.50 mg/kg y cantidad mínima cuantificable (CMC) entre 0.01-1.00 mg/kg. Los porcentajes de recuperación estuvieron entre el 80-110%, en el rango de calibración para la mayoría de plaguicidas evaluados. Con respecto a la distribución del analito en la muestra, se demostró su homogeneidad. Se aplicó la metodología a muestras reales, encontrándose principalmente residuos de Captan por debajo de los límites máximos de residuos (LMR).

ABSTRACT

This study describes the validation of multiresidue analytical methodology for the simultaneous determination of 19 organochlorine, organophosphorus and organonitrogen pesticides in strawberry. Pesticides residues were extracted from strawberry samples with ethyl acetate, the extracts were cleaned-up by GPC, the quantitative analysis was carried out by high resolution gas chromatography (GC) with a pulsed splitless injection mode and simultaneous detection by μ -ECD and NPD coupled in parallel.

¹ Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. A. A. 14490. Bogotá, Colombia.
E-mail: jairo709@ciencias.unal.edu.co

The methodology is specific, selective, accurate and robust. The calibration curves in matrix matched analytical standards show linearity over the concentration range of 0.04-5.00 mg/kg with limits of detection and quantitation between 0.007-0.5 mg/kg and 0.01-1.00 mg/kg respectively. The recovery experiments yielding averages between 80-110% for most of the pesticides. The distribution of the analyte in the laboratory sample was evaluated and it was found its homogeneity. The methodology was applied in field samples and was mainly found captan residues below MRL.

INTRODUCCIÓN

Los residuos de plaguicidas en productos agrícolas son un problema a nivel mundial; la producción sostenible de alimento para los más de 6 mil millones de habitantes en nuestro planeta genera la utilización intensiva de estos compuestos. En países como Colombia, el problema se agrava debido a la insuficiencia de mecanismos de control por parte de las entidades gubernamentales y a la carencia de información de nuestros agricultores sobre el uso y manejo de plaguicidas, generando muchas veces la sobreformulación. En consecuencia, se hace necesario desarrollar metodologías validadas para llevar a cabo estudios de residualidad en cosechas, ambientes agrícolas y productos de exportación; y con ello apoyar los esfuerzos de las entidades gubernamentales relacionadas con el control de la producción agrícola y la seguridad alimentaria.

Metodologías como las del AOAC (1), de Kadenzcki (2) y de Spech (3) son usadas actualmente por los organismos de control en el análisis de residuos de plaguicidas en material vegetal, pero ellas incluyen un paso de partición líquido-líquido con solventes generalmente clorados; en cambio, metodologías como la del método oficial holandés (4) usan una extracción con acetato de etilo que no requiere posterior partición líquido-líquido. Con el objeto de eliminar coextractantes de la matriz tales como clorofilas, colorantes, lípidos y proteínas, se aplican a los extractos diferentes técnicas de limpieza como extracción en fase sólida, SPE (5,6), y cromatografía de permeación en geles, GPC (3,4,7). El análisis cuantitativo se lleva a cabo mediante técnicas como cromatografía de gases de alta resolución, CGAR, y cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC.

Un sistema de aseguramiento de calidad, en conjunto con la evaluación de los parámetros de validación, ofrece la posibilidad de asegurar datos precisos, exactos y confiables; actualmente los procedimientos de validación intralaboratorio (8,9) son una valiosa herramienta para asegurar la confiabilidad de los resultados de la metodología.

Teniendo en cuenta lo anterior, en este documento se presenta la validación de una metodología para analizar residuos de plaguicidas en fresa –un producto considerado con alto riesgo de presentar residuos (10)– y su aplicación para determinar residualidad en muestras reales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales de referencia, reactivos y soluciones

Los materiales de referencia de plaguicidas con porcentajes de pureza entre 98-100% se obtuvieron del Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany); los plaguicidas analizados se relacionan en la tabla 1. El acetato de etilo, ciclohexano grado residuos de plaguicidas, bicarbonato de sodio grado analítico y sulfato de sodio anhidro grado residuos se obtuvieron de J.T. Beaker y Mallinckrodt. Se prepararon soluciones madre de los materiales de referencia en concentración cercana a 1.000 mg/mL en acetato de etilo, las cuales se almacenaron en congelador a -20°C . Las mezclas de los plaguicidas se prepararon en concentraciones entre 0.20-30 $\mu\text{g/mL}$ en acetato de etilo por dilución de las soluciones madre; éstas se almacenaron en congelador a -20°C .

Muestras blanco

Las fresas exentas de plaguicidas, que fueron utilizadas como blanco de matriz, se tomaron de la finca Betania y del Centro de Investigaciones Agroindustriales de la Universidad Jorge Tadeo Lozano.

Instrumentación

Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 Plus (Palo Alto, CA, USA) con control electrónico de presión, equipado con un detector de microcaptura electrónica $\mu\text{-ECD}^{63}\text{Ni}$, y un detector de nitrógeno-fósforo NPD, acoplados en paralelo mediante un divisor de flujo (Y) de borosilicato al final de una columna capilar HP-5 (30 m x 0,35 mm d.i., $\text{df } 0,25 \mu\text{m}$). Las condiciones cromatográficas utilizadas en el análisis de los pla-

guicidas fueron las siguientes: volumen de inyección 2 μL ; inyección en modo *splitless* pulsado con presión de pulso de 40 psi durante 0,4 min; tiempo de purga de 1,0 min y temperatura del inyector de 240°C . El gas de transporte fue nitrógeno, utilizando modo de presión constante a 6,5 psi. El programa de temperatura seguido fue el siguiente: temperatura inicial 50°C , incremento de 4°C/min hasta 100°C , incremento de 1°C/min hasta 120°C ; se mantuvo a esta temperatura durante 1 min; incremento de 10°C/min hasta 170°C , incremento de 3°C/min hasta 240°C , incremento de 35°C/min hasta 300°C ; se mantuvo a esta temperatura durante 7 min. La temperatura del detector de $\mu\text{-ECD}$ fue de 300°C , con flujo de nitrógeno de 30 mL/min como gas auxiliar. El detector NPD se trabajó a 300°C , con flujos de gas auxiliar de 5 mL/min, de H_2 de 4 mL/min y de aire de 60 mL/min. Todas las muestras se inyectaron en acetato de etilo. En el proceso de extracción y limpieza se utilizaron un homogeneizador Stephan Blender 2010, un homogeneizador de alta velocidad Ultraturrax T25 (IKA) y un equipo de GPC KL-SX-3 de Redemend Bt, este último empacado con un polímero de estireno-divinilbenceno a 3% de entrecruzamiento. Las condiciones en este equipo fueron: solvente de elución acetato de etilo-ciclohexano (1:1); flujo de elución 1 mL/min.

Procedimiento de extracción y limpieza

La metodología aplicada se obtuvo como resultado de una evaluación y adaptación de las usadas en diferentes laboratorios de control a nivel internacional (2,3,4). El procedimiento seguido se muestra en la figura 1.

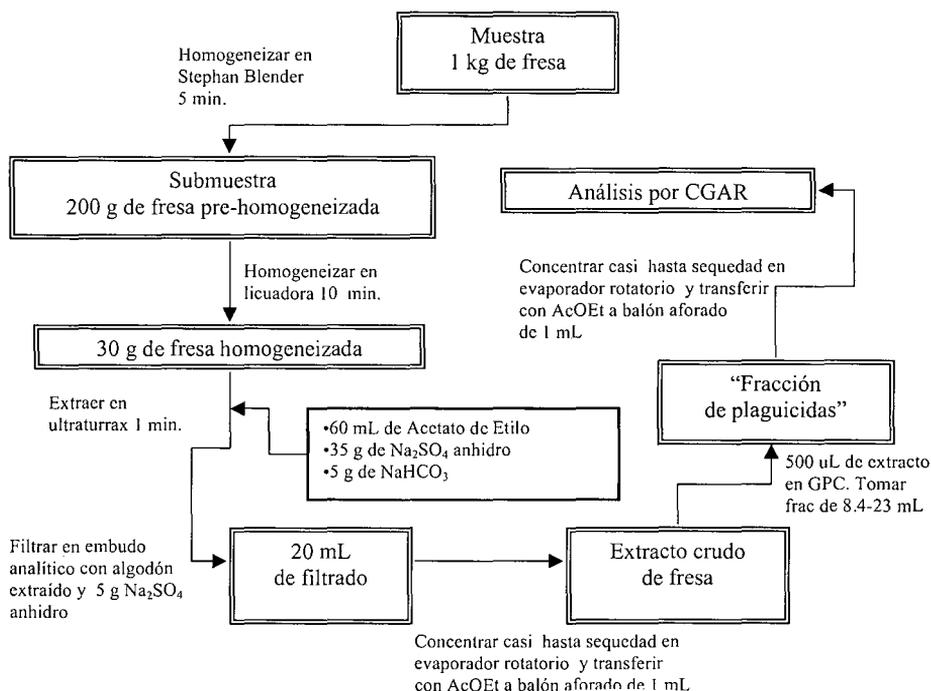


Figura 1. Procedimiento de extracción y limpieza de muestras.

Procedimiento de validación

La evaluación de los diferentes parámetros de validación se llevó a cabo con fresas exentas de plaguicidas (matriz blanco), teniendo en cuenta los lineamientos internacionales sobre validación intralaboratorio (8,9). Como se observa en la tabla 1, los rangos de calibración cubren el valor del límite máximo de residuos, LMR, para aquellos plaguicidas reportados por el Codex Alimentarius en fresa (11); para los que no se reporta LMR, se trabajó alrededor de la cantidad mínima cuantificable, CMC.

Para la preparación de las curvas de calibración con cuatro niveles, se adicio-

nó mezcla de plaguicidas al extracto de matriz blanco en las concentraciones correspondientes al rango de calibración después de la limpieza por GPC. Para los ensayos de precisión y porcentaje de recuperación se adicionó mezcla de plaguicidas, en concentraciones equivalentes al rango de concentración, a los 30 g de fresa que se utilizaron como muestra analítica, y después se realizó el procedimiento de extracción y limpieza. Para la evaluación de la homogeneidad, se fortificó 1 kg de fresa con solución patrón de tres plaguicidas, considerados como representativos a un nivel de calibración; luego se desarrolló la metodología completa. Se llevó a cabo el estudio de robustez, eva-

Tabla 1. Tiempos de retención, resolución y rango de calibración de los plaguicidas analizados.

COMPUESTOS DETECTABLES POR μ -ECD				
COMPUESTO	tR (min)	R	Rango de calibración (mg/kg)	LMR (mg/kg)
Diclorvozo	21,195		0,60 - 2,4	
HCB	44,091	2,4	0,16 - 0,65 [⊗]	3,0
Dimetoato	44,718	4,5	0,40 - 1,6	1,0
γ -HCH	45,582	6,6	0,61E-2 - 0,24	
Clorotalonil	47,394	3,9	0,30 - 1,2	
m-Paratión	49,330	5,3	0,10 - 0,42	
Malatión	51,590	2,1	0,22 - 0,87	
Clorpirifos	52,151	4,3	0,16 - 0,66	
Captan	54,495	5,1	0,63 - 2,5 [⊗]	20
Profenofos	57,459	8,8	7,4E-2 - 0,30	
p,p'-DDT	62,315	> 10	2,1E-2 - 8,3E-2	
Pirazofos	65,981	> 10	0,17 - 0,67	0,2
Endosulfanes [Ⓝ]	56,089 - 59,555	3,4 - > 10	0,54 - 2,2	2,0

COMPUESTOS DETECTABLES POR NPD				
COMPUESTO	tR (min)	R	Rango de calibración (mg/kg)	LMR (mg/kg)
Metamidofos	20,640		3,0 - 12	
Acefato	36,051	> 10	0,41 - 1,6	
Monocrotofos	43,790	> 10	1,5 - 5,8	
Dimetoato	44,719	4,28	0,40 - 1,6	1,0
Diazinon	43,792	2,47	6,0E-2 - 0,24	0,5
Clorotalonil	47,252	4,07	0,30 - 1,20	
m-Paratión	49,330	> 10	0,10 - 0,42	
Metalaxil	50,108	5,64	0,42 - 1,7	
Malatión	51,590	> 10	0,22 - 0,87	
Clorpirifos	52,151	3,71	0,16 - 0,66	
Fenamifos	56,981	> 10	8,2E-2 - 0,32	
Profenofos	57,460	1,75	7,4E-2 - 0,30	
Pirazofos	65,976	7,45	0,17 - 0,67	0,2

tR: tiempo de retención; R: resolución a mitad de altura, LMR: límite máximo de residuos en fresa según Codex Alimentarius (11).

⊗: el rango de calibración se encuentra a 1/10 del LMR para evitar saturación de detectores.

Ⓝ: como la mezcla de isómeros α y β

luando variables de relevancia para el desarrollo de la metodología.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Validación instrumental

El sistema instrumental demuestra ser específico y selectivo, puesto que no se presentan señales, debidas a las impurezas propias de los materiales de referencia o al solvente, que interfieran con las señales de los analitos. Adicionalmente, demuestra ser preciso bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad (10); las curvas de calibración en solvente presentan linealidad, regresión y convergencia al origen; además, el sistema instrumental demostró idoneidad durante el proceso de validación. Las señales cromatográficas en NPD presentan intenso coleo, especialmente para compuestos organofosforados. Monocrotofos y acefato exhiben deformaciones en la señal que se intensifican con el tiempo.

Validación de la metodología

Especificidad y selectividad. La metodología demuestra ser específica y selectiva, puesto que el programa de temperatura usado permite separar adecuadamente las señales de los analitos de los interferentes de la matriz; en la tabla 1 se observan los tiempos de retención y el valor de la resolución para todos las señales que aparecen en el cromatograma. La figura 2 muestra el cromatograma de la mezcla de plaguicidas en extracto de matriz al segundo nivel de calibración en μ -ECD y NPD.

Linealidad. En la tabla 2 se presentan las ecuaciones con las que se modelaron las curvas de calibración por el método de mínimos cuadrados ordinario a 4 niveles de concentración; se encontró que para la mayoría de plaguicidas, las curvas de calibración en extractos de matriz fortificados presentan regresión, linealidad, pendientes estadísticamente diferentes de cero y convergencia al origen, con una confiabilidad del 95%.

Precisión. Se evaluó la precisión bajo condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad con 3 réplicas a 4 niveles de calibración, dando como resultado RSD menores a 20% y 28% respectivamente.

Exactitud. Como se observa en la tabla 2, los compuestos presentan porcentajes de recuperación entre 54,7-110% (10), y desviación estándar relativa, RSD, no mayor a 28% (10). Acefato y metamidofos presentan %R menores a 70%; por lo tanto, se debe considerar una metodología particular para su análisis. Para la mayoría de plaguicidas, el porcentaje de recuperación no difiere estadísticamente del 100%.

Sensibilidad. Como se observa en la tabla 3, la metodología demuestra ser sensible para el análisis de plaguicidas en fresa, puesto que los valores para CMD y CMC se encuentran muy por debajo del LMR y en el orden de los $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Otros parámetros. Se encontró también que el proceso de homogeneización es adecuado, puesto que, luego de fortificar 1 kg de fresa y tomar de allí 5 replicas, se encontraron valores de RSD entre 4-12%. Adicionalmente, se determinó que la metodología es robusta, evaluando 7 variables de acuerdo al diseño experi-

Tabla 2. Resultados de la evaluación de linealidad y exactitud para la metodología.

COMPUESTOS DETECTABLES POR μ -ECD				
COMPUESTO	LINEALIDAD		EXACTITUD	
	Area = b [mg/kg] \pm a	r	%R	RSD
Diclorvozo	$y = 1,39E5 x + 6,68E3$	1,000	80,3 [⊙]	11
HCB	$y = 1,56E6 x + 3,58E4$	1,000	94,9	7,8
Dimetoato	$y = 4,44E5 x + 1,52E4$	0,998	110	19
γ -HCH	$y = 2,86E6 x - 1,48E2$	1,000	94,9	8,3
Clorotalonil	$y = 2,12E6 x + 5,83E$	1,000	93,1	10
m-Paratión	$y = 6,57E5 x + 1,42E3$	1,000	98,5	7,6
Malatión	$y = 2,55E5 + 1,58E5$	1,000	101	7,2
Clorpirifos	$y = 1,01E6 x + 4,35E3$	1,000	96,6	7,5
Captan	$y = 1,21E6 x - 2,39E5$	0,993	94,3	12
Profenofos	$y = 9,45E5 x - 5,52E3$	0,997	101	8,0
p,p'-DDT	$y = 1,55E6 x - 1,90E4$	0,993	92,4 [⊙]	7,9
Pirazofos	$y = 1,25E5 x + 6,67E2$	1,000	92,7	15
Endosulfanes	$y = 1,99E6 x + 5,58E4$	1,000	97,3	7,2

COMPUESTOS DETECTABLES POR NPD				
COMPUESTO	LINEALIDAD		EXACTITUD	
	Area = b [mg/kg] \pm a	r	%R	RSD
Metamidofos	$y = 4,21E3 x - 9,56E2$	0,997	63,9 [⊙]	26
Acefato	$y = 3,36E3 x + 3,78E2$	0,999	54,7 [⊙]	28
Monocrotofos	$y = 2,47E3 x - 2,37E2$	0,999	86,5 [⊙]	12
Dimetoato	$y = 2,74E3 x - 6,94E1$	0,999	96,4	8,7
Diazinon	$y = 2,35E3 x + 3,39E1$	1,000	88,4	24
Clorotalonil	$y = 1,05E2 x + 2,34E1$	0,993	97,1	16
m-Paratión	$y = 2,28E3 x - 7,28E1$	0,998	98,1	11
Metalaxil	$y = 7,94E1 x - 1,19E0$	1,000	96,9	8,8
Malatión	$y = 2,28E3 x - 7,02E1$	0,999	94,9	11
Clorpirifos	$y = 3,79E3 x - 3,30E2$	0,996	98,2	8,5
Fenamifos	$y = 2,17E3 x - 3,61E1$	1,000	95,7	8,1
Profenofos	$y = 2,47E3 x - 1,06E2$	0,994	96,8	8,1
Pirazofos	$y = 2,21E3 x - 1,29E2$	1,000	88,4	21

b: pendiente, a: intercepto, r: coeficiente de correlación; %R: porcentaje de recuperación promedio; RSD: desviación estándar relativa para 5 réplicas a 4 niveles de concentración bajo condiciones de reproducibilidad.

⊙: el %R difiere estadísticamente del 100% con una confiabilidad de 95%.

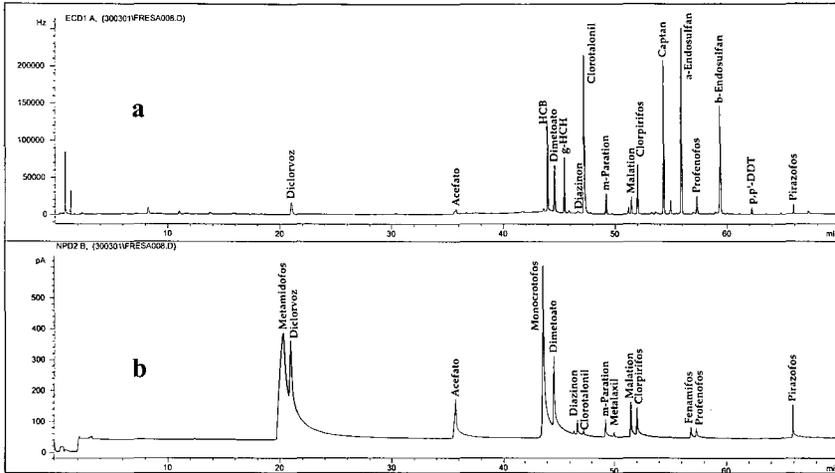


Figura 2. Mezcla de plaguicidas en extracto de matriz fortificado al segundo nivel de calibración. a) μ -ECD b) NPD.

Tabla 3. Límites de detección y cuantificación para los plaguicidas analizados.

COMPUESTO	LÍMITES CRÍTICOS				LMR (mg/kg)
	μ -ECD		NPD		
	CMD (mg/kg)	CMC	CMD (mg/kg)	CMC	
Metamidofos			1,8	2,9	
Diclorvoz	0,028	0,055			
Acefato			0,13	0,25	
HCB	0,029	0,056			3,0
Dimetoato	0,22	0,40	0,13	0,25	1,0
Diazinon			0,010	0,019	0,5
γ -HCH	0,016	0,030			
Clorotalonil	0,065	0,13	0,26	0,30	
m-Paratión	0,027	0,052	0,057	0,10	
Metalaxil			0,082	0,16	
Malatión	0,037	0,081	0,087	0,16	
Clorpirifos	0,040	0,077	0,12	0,16	
Captan	0,61	0,63			20
Fenamifos			0,0070	0,017	
Profenofos	0,044	0,070	0,069	0,070	
p,p'-DDT	0,020	0,021			
Pirazofos	0,0080	0,017	0,022	0,043	0,2
Endosulfanes	0,080	0,16			

CMD: cantidad mínima detectable; CMC: cantidad mínima cuantificable, determinada por el método de Meier&Zund; LMR: límite máximo de residuo en fresa según Codex Alimentarius (11).

mental de Placket y Burman (12); se debe controlar la temperatura del baño en $35^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ en el evaporador rotatorio, pues esta variable puede alterar significativamente los resultados obtenidos.

Análisis de muestras. Siguiendo un diseño de muestreo aleatorio estratificado, se analizaron 20 muestras de fresa tomadas de los municipios de Facatativá, Sibacá y Guasca, departamento de Cundinamarca, los mayores productores de este fruto en Colombia. Se encontraron residuos, principalmente de Captan, en un 70% de las muestras analizadas, en un rango de concentraciones de 0,46 a 2,8 mg/kg; en todos los casos, las concentraciones determinadas estuvieron por debajo del LMR. Estos resultados indican que los niveles de plaguicidas encontrados en este estudio no implican riesgo para la salud del ser humano; sin embargo, es necesario desarrollar programas de monitoreo de residuos de plaguicidas con el objeto de proteger al consumidor.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros agradecimientos al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, y al Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA), Viena, Austria, por la colaboración y financiación suministrada para la realización de este proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sawyer, L. D. (1990). Pesticide and industrial chemical residues. En: *Official Methods of Analysis, AOAC, agricultural chemicals, contaminants and drugs*. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, USA., pp. 274-290.
2. Kadenczki, L. y otros. (1992). Column extraction of residues of several pesticides from fruits and vegetables: a simple multiresidue analysis method. *J. AOAC Int.* **75** 53-61.
3. Specht, W.; Tilkes, M. (1985). Gaschromatographische bestimmung von rüständen an pflanzanbehandlungs-mitteln nach clean-up über gel-chromatographie und mini-kieselgel-säulen-chromatographie. *Fresenius Anal. Chem.* **322** 443-445.
4. Ministry of Public Health, Welfare and Sport. (1996). *Method development for multiresidues pesticide analysis*. General Inspectorate for Health Protection: Netherlands. **6** (1).
5. Nakamura, Y. y otros. (1994). Multiresidue analysis of 48 pesticides in agricultural products by capillary gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **42** 2508-2518.
6. Mark Lee, S. y otros. (1991). Multi-pesticide residue method for fruits and vegetables: California Department of Food and Agriculture. *Fresenius Anal. Chem.* **339** 376-383.
7. Gelsomino, A. y otros. (1997). Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. *J. Chromtogr.* **782** 105-122.
8. Ambrus, A.; Fajgelj, A. (2000). Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentrations of organic

- chemicals. En: *Principles and practices of method validation*. Royal Society of Chemistry: UK., pp.179-253.
9. In-house method validation. (1998). COC, Codex Committee on Method of Analysis and Sampling. 22 sesion. Budapest, Hungary.
 10. Nausa, O. F.; Piedrahita, W. (2001). *Diagnóstico de patrones de uso y manejo de plaguicidas en frutas de clima frío en el Departamento de Cundinamarca*. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
 11. Codex Alimentarius. (2000). FAO-OMS. **2B**
 12. Quattrocchi, O.; Abelaira de Andrizzi, S.; Laba, R. (1992). *Introducción a la HPLC: Aplicación práctica*. Editorial Artes Gráficas Farro: Argentina, pp. 154-173, 301-328.