



Desarrollo de una metodología para el análisis de residuos de plaguicidas en leches mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Johanna P. Abella G.

Centro de Biosistemas, Universidad Jorge Tadeo Lozano

johannap.abellag@utadeo.edu.co

Erika P. Salazar S.

Departamento de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad Jorge Tadeo Lozano

erikasalazar90@gmail.com

Sofía de Valenzuela G.

Departamento de Ingeniería, Universidad Jorge Tadeo Lozano

sofival_92@hotmail.com

Adriana M. Zamudio S.

Centro de Biosistemas, Universidad Jorge Tadeo Lozano

adriana.zamudio@utadeo.edu.co

Diego A. Ahumada F.

Centro de Biosistemas, Universidad Jorge Tadeo Lozano

diego.ahumadaf@utadeo.edu.co

Resumen

Se desarrolló un método multiresiduo para el análisis de plaguicidas en leche mediante el empleo de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Se estudiaron diferentes variaciones al método de extracción QuEChERS utilizando siete diferentes fases extractantes, dos sales amortiguadoras, tres concentraciones de ácido fórmico en la fase extractante y cuatro tiempos de ultrasonido. De los 58 plaguicidas analizados solo tiociclam y tiodicarb presentaron porcentajes de recuperación inferiores al 70%. Los mejores porcentajes de recuperación y menores coeficientes de variación se obtuvieron empleando el *buffer* de citrato y acetonitrilo con ácido fórmico al 0,5% como extractante. Por otro lado, no se observaron diferencias estadísticas ($P > 0,05$) a los tiempos de ultrasonido evaluados. Finalmente, se encontró que el método aplicado es preciso y exacto para

el análisis de residuos de plaguicidas de diferentes grupos químicos como: azoles, organofosforados, bencimidazoles, carbamatos, entre otros.

Palabras clave: alimento, leche, pesticidas, QuEChERS.

Abstract

It was developed a multi-residue method for determining pesticides of different physicochemical characteristics presents on milk. The extraction process is based on the QuEChERS method and determination of the compounds was performed using ultra performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Also, were evaluated seven different phases of extraction, the effect of different times of ultrasound and three concentrations of formic acid on the extraction process. The repeatability of the method results indicated that for most of the compounds showed coefficients of variation below 10%. Furthermore, it was found that there were no statistical differences ($P > 0.05$) at different times of ultrasound evaluation. Finally, it was found that the developed method is precise and accurate for the analysis of pesticide residues from different chemical groups such as azoles, organophosphorus, benzimidazoles, carbamates, among others.

Keywords: food, milk, pesticides, QuEChERS.

Índice temático

[Introducción](#)

[Materiales y métodos](#)

[Resultados y discusión](#)

[Conclusiones](#)

[Agradecimientos](#)

[Referencias](#)

OPCION: CLICK DIRECTO A CADA CAPITULO

Introducción

La apertura del comercio mundial y las crecientes exigencias de los consumidores respecto a la calidad de los alimentos, ha inducido una serie de beneficios dentro de los que se destacan un mayor empleo de buenas prácticas agrícolas y veterinarias, superior conocimiento de temas relacionados con la seguridad alimentaria, mejor control de las entidades gubernamentales en cuanto a la inocuidad de los alimentos y en general, una conciencia por la producción y consumo de alimentos más sanos (Hefnawy, 2011; Ingram, 2011). De manera paralela a estos beneficios, en la última década en los países desarrollados se ha incrementado el número de políticas respecto al contenido de contaminantes en alimentos, lo cual conduce a un menor riesgo para la salud del consumidor, pero trae consigo un mayor número de restricciones para los productores y comercializadores de países exportadores, como es el caso de Colombia (Engler, Nahuelhual, Cofré y Barrena, 2012; Zweigenbaum, 2011).

Debido a su composición, la leche es uno de los alimentos de más importancia para la nutrición humana, pues se sabe que es una fuente de aminoácidos, sacáridos, ácidos grasos, entre otros; la calidad de la leche es determinada por sus características bacteriológicas, fisicoquímicas y en esencia, además de sus cualidades composicionales (proteína, grasa, minerales, vitaminas, etc.) esta no debe contener una cantidad excesiva de microorganismos y residuos químicos (Clemens, Hernell y Michaelsen, 2011). Dentro de los contaminantes químicos relevantes que puede contener una leche, se encuentran los antibióticos y plaguicidas, los primeros son usados para la protección del ganado y los segundos pueden provenir de diferentes fuentes como: (i) pastos, forrajes o alimentación de origen vegetal, que han sido tratados con estos agroquímicos; (ii) empleo de estas moléculas para el control de parásitos en el ganado; (iii) control de plagas en establos o fincas lecheras, y (iv) contaminación de fuentes de agua, suelos y aire con plaguicidas provenientes de prácticas agrícolas (Decker, 1959).

Desde este panorama, la comunidad científica ha encaminado sus esfuerzos al desarrollo de metodologías analíticas que permitan la detección de este tipo de contaminantes (De Brabander et al., 2009). Las metodologías analíticas existentes, incluyen desde la utilización de inmunoensayos (Jin et al., 2012) y biosensores (Mishra, Domínguez, Bhand, Muñoz y Marty, 2011) hasta el manejo de técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas (Mezcua et al., 2007; Rouvière,

Buleté, Cren-Olivé y Arnaudguilhem, 2012), siendo estas últimas las de mayor relevancia en el control de dichos residuos en alimentos. Los análisis de residuos de plaguicidas en leches se dan desde hace varias décadas, sin embargo, se han centrado sobre todo en la detección de moléculas organocloradas y organofosforadas (Jeong, Kwak, Ahn y Jeong, 2012; Kampire, Kiremire, Nyanzi y Kishimba, 2011). Por su parte, las diferentes entidades encargadas de fijar los límites máximos de residuos (LMR), en los últimos años ha aumentado en más de 4 veces el número de plaguicidas con restricciones en este alimento, lo cual se traduce en la necesidad de desplegar métodos analíticos que permitan realizar la detección de plaguicidas de diferentes grupos químicos (Joint, 2011).

El estudio de residuos de plaguicidas en leches, a través de técnicas cromatográficas, se divide en cuatro etapas fundamentales: (i) extracción, (ii) limpieza, (iii) cuantificación y (iv) confirmación. Según el tipo de plaguicida que se desee determinar, se reportan diferentes técnicas de extracción, como la extracción líquido-líquido (ELL), extracción en fase sólida (EFS), microextracción en fase sólida (MEFS), extracción acelerada con solventes (EAS), entre otras. La ELL es la técnica más empleada, sobre todo por su sencillez y eficiencia en la extracción de moléculas de diferentes características fisicoquímicas respecto a otras técnicas (Martínez, Plaza-Bolaños, Romero-González y Garrido, 2009).

Ninguna de las técnicas de extracción reportadas son lo suficientemente selectivas para la extracción de residuos de plaguicidas, por lo tanto, es necesario una etapa adicional en el proceso analítico, la cual corresponde a la limpieza, que tiene como objetivo eliminar todos aquellos componentes que puedan afectar el proceso de detección. Para el caso específico de leches, los principales interferentes corresponden a lípidos, vitaminas y, de manera común, compuestos liposolubles que se encuentran presentes en la leche. Como solución a este inconveniente, se aprovechan diferentes técnicas como la cromatografía de permeación en gel, la EFS, la ELL y más recientemente el uso de adsorbentes como la amina primaria secundaria (APS) o octadecilsilano (C18) (Chung y Chen, 2011; Gilbert-López, García-Reyes y Molina-Díaz, 2009; LeDoux, 2011).

En el último lustro, el manejo de metodologías analíticas basadas en el método QuEChERS son la mejor opción para el análisis de, no solo residuos de plaguicidas, sino de otros contaminantes como antibióticos y colorantes (Filigenzi, Ehrke, Aston y Poppenga, 2011). El método QuEChERS ofrece como principales ventajas resultados exactos, precisos y rápidos, además de permitir el uso

de bajas cantidades de solventes, reactivos y, en general, material de laboratorio (Anastassiades, Lehotay, Tajnbaheer y Schenck, 2003).

Teniendo en cuenta dicho contexto, en este artículo se presentan los resultados del desarrollo de una metodología basada en el método QuEChERS, para la determinación de residuos de plaguicidas en leches. Para ello se estudiaron diferentes variables que afectan el proceso de extracción. La cuantificación y confirmación de las moléculas se realiza mediante cromatografía líquida ultrarrápida acoplada a espectrometría de masas.

Materiales y métodos

Materiales de referencia, reactivos y soluciones

El desarrollo del método se realizó para el análisis de 58 principios activos, dentro de los que se encuentran moléculas organofosforadas, organonitrogenadas, azoles, triazinas, carbamatos, benzimidazoles, entre otros. Todos los estándares de plaguicidas presentaban una pureza mayor al 95% y fueron adquiridos de las casas comerciales Dr. Ehrenstorfer y Chemservice. Los reactivos restantes, la calidad, las condiciones de preparación y almacenamiento se encuentran reportados en trabajos previos (Ahumada y Zamudio, 2011).

Instrumentos y equipos

El análisis cromatográfico se hizo en un cromatógrafo líquido ultrarrápido (UFLC por su sigla en inglés: Ultra Fast Liquid Chromatograph) Shimadzu Prominence (Maryland, CA, Estados Unidos), acoplado a un detector selectivo de masas LCMS-2020 (Ahumada y Zamudio, 2011).

Los análisis fueron realizados en una columna Shim Pack (6 cm × 2 mm d.i., tamaño de partícula de 2,1 μm y fase estacionaria C18), se trabajó en modo de gradiente con ácido fórmico al 0,1% (P/V) y acetato de amonio 5 mM en agua Milli-Q, la fase orgánica empleada fue acetonitrilo. El volumen de inyección fue 5 μL, la temperatura de columna 40°C y el flujo de fase móvil 0,3 mL/min.

El equipo cuenta con una interfaz tipo DUIS (ESI, APCI), que se operó en modo ESI, con un flujo de gas de secado de 10 L/min y un flujo de gas nebulizador de 1,5 L/min, las temperaturas del bloque de calentamiento y de la línea de eliminación del solvente correspondieron a 200°C y 250°C respectivamente.

Los análisis fueron llevados de manera simultánea en modo positivo y negativo, el voltaje aplicado en el capilar correspondió a 4500 V y -4500 V respectivamente. Todos los análisis fueron realizados en modo SIM (por su sigla en inglés, Single Ion Monitoring).

En todos los ensayos se empleó tributilfosfato como estándar interno y el análisis de los 58 principios activos se hizo a través de dos inyecciones en el cromatógrafo. En la mayoría de los casos, las concentraciones a las cuales se realizaron cada uno de los ensayos son iguales o inferiores al LMR del *codex alimentarius*, no obstante, algunos plaguicidas incluidos en el presente estudio no presentan aún LMR.

Material de estudio

Se utilizó como material de estudio leche en polvo, adquirida en un mercado local. Esta fue reconstituida atendiendo a las instrucciones presentadas por el fabricante en la etiqueta del producto, que corresponden a disolver 25 g de leche en polvo en 200 mL de agua. Se seleccionó la leche en polvo como material de estudio, con el propósito de mantener durante el desarrollo del mismo, unidades experimentales homogéneas y así evitar introducir otra variable que afecte los resultados. El contenido total de grasa de esta leche corresponde al 7%.

Método de extracción

Para la extracción se pesaron 10 g de leche reconstituida, se adicionó 10 mL del solvente de extracción, se agitó por 1 min de manera manual, luego se sumaron 4 g de sulfato de magnesio anhidro y la sal o sales usadas como *buffer*, nuevamente se agitó por 1 min y se centrifugó por 4 min a 5.500 rpm, con el propósito de separar la fase orgánica (Ahumada y Zamudio, 2011).

Método de limpieza de los extractos

Para el proceso de limpieza, se partió de los resultados obtenidos en estudios previos y los alcanzados en otras investigaciones para el análisis de residuos de plaguicidas en matrices con alto contenido lipídico (Chen et al., 2009). De esta manera, se tomaron 4 mL de la fase orgánica, se agregaron 600 mg de sulfato de magnesio anhidro, 100 mg de APS y 100 mg de octadecilsilano (C18), se agitó durante 2 min en un vórtex. Después se llevaron los tubos a refrigeración a -15°C por un tiempo de 2 horas para finalmente centrifugar las muestras a 5.500 rpm durante 2 min a 4°C. Por

último, se filtró la fase orgánica a través de una membrana de PTFE de 0,20 μ m, se transfirió una alícuota de 1000 μ L a un vial de cromatografía y se añadieron 20 μ L de una solución de 15 μ g/mL de estándar interno.

Resultados y discusión

Evaluación de las condiciones de extracción (solvente – pH)

El método QuEChERS emplea en su fase de extracción acetonitrilo como solvente orgánico y sales que permiten mantener el control del pH (*buffer* de acetato de sodio o de citrato), esta adición de sales se realiza con el propósito de minimizar la degradación de compuestos susceptibles a procesos de hidrólisis y favorecer la extracción de plaguicidas que puedan ionizarse a valores de pH superiores a 7. En el presente estudio, se seleccionaron siete fases extractantes: acetonitrilo (ACN), acetonitrilo con 1% ácido acético (ACN-ACÉTICO), acetonitrilo con 1% ácido fórmico (ACN-FÓRMICO), acetato de etilo (ACOET) y mezclas de acetato de etilo: acetonitrilo (1:1) (ACN-ACOET), metanol: acetonitrilo (1:1), metanol: acetato de etilo (1:1). Así mismo, la extracción realizada utilizando cada fase extractante se hizo con dos sistemas de amortiguación de pH: acetato y citrato, de acuerdo con las dos variaciones más relevantes del método (Lehotay et al., 2010). Este estudio se realizó mediante un diseño factorial con cuatro réplicas por tratamiento.

Los resultados obtenidos en esta evaluación, mostraron que las mezclas con metanol no resultan apropiadas para la extracción de plaguicidas en ninguno de los dos ensayos de regulación de pH (acetato y citrato), estos resultados se atribuyen a la dificultad que se encontró en la separación de la fase orgánica con la fase acuosa, lo cual se atribuye a la alta miscibilidad que tiene el metanol con el agua; y aunque se llevó a cabo la adición de NaCl y MgSO₄ para efectuar el *salting out* o separación de las fases, estas no brindaron las condiciones suficientes de fuerza iónica para obtener una adecuada separación. Con base en estos resultados, se descartó el uso de las mezclas con metanol como solvente de extracción.

Las figuras que se presentan a continuación se construyeron con intervalos arbitrarios que posibilitaran ver las diferencias entre las diversas alternativas de extracción evaluadas; ya que de haberse escogido el intervalo planteado por la Unión Europea (70% a 120%) (Sanco, 2011), la

mayoría de compuestos se hallarían en este intervalo, impidiendo tener un criterio de selección del método.

La figura 1 muestra la distribución del número de plaguicidas recuperados para cada extractante usando el sistema citratos como amortiguador. Allí se observa que para todas las fases extractantes evaluadas, se obtiene una recuperación en un intervalo entre 80% y 110% que supera el 70% de los compuestos analizados. Sin embargo, se puede advertir que a medida que disminuye la constante dieléctrica del solvente de extracción, se encuentra un descenso en el número de compuestos que presentan porcentajes de recuperación en este rango. En esta figura se observa que la mejor alternativa corresponde a la extracción con acetonitrilo, no obstante, es de resaltar que dentro de los 11 compuestos que tiene el acetonitrilo en el rango inferior al 80%, presenta siete compuestos para los que el método no es exacto, es decir, que tienen recuperaciones inferiores al 70%. Por otro lado, la segunda mejor alternativa corresponde a la extracción de acetonitrilo con fórmico, en cuyo caso solo presenta cinco compuestos con porcentajes de recuperación inferiores al 70%.

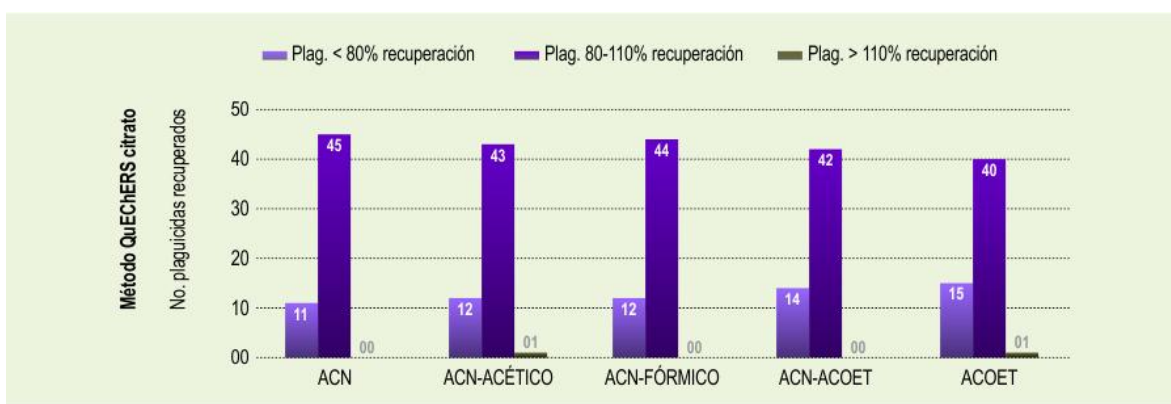


Figura 1. Plaguicidas recuperados para cada una de las fases extractantes evaluadas empleando el método QuEChERS citrato; clasificados según el porcentaje de recuperación.

La figura 2, muestra la distribución de los porcentajes de recuperación para cada extractante evaluado, usando el método QuEChERS con acetato. En este caso, el número de plaguicidas recuperados supera solo el 55% del total evaluado, lo que implica que al usar este sistema de amortiguación se presentan recuperaciones más alejadas del 100%.

Al comparar los resultados de las figuras 1 y 2, se evidencia que mediante la utilización de sales de citrato se obtienen mejores porcentajes de recuperación, lo cual se adjudica a que posiblemente el pH que se obtiene con este sistema favorece la estabilidad de los plaguicidas examinados y por lo tanto aumenta su porcentaje de recuperación en la matriz de estudio (Pizzutti, De Kok, Hiemstra, Wickert y Prestes, 2009). Con base en estos resultados, se determinó que las condiciones apropiadas de pH proporcionadas por la adición de sales del método QuEChERS se alcanzan con el *buffer* de citrato obteniendo la recuperación de la mayoría de los plaguicidas en estudio.

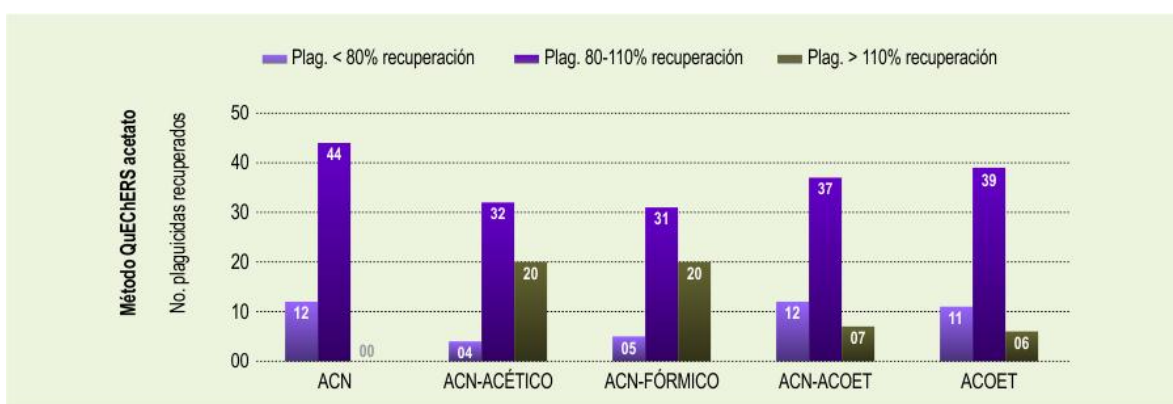


Figura 2. Plaguicidas recuperados para cada una de las fases extractantes evaluadas empleando el método QuEChERS acetato; clasificados según el porcentaje de recuperación.

La selección de la fase extractante que ofrece las mejores condiciones químicas de afinidad para extracción de plaguicidas en leches, se realizó con fundamento en los plaguicidas recuperados, considerando como intervalo de recuperación el establecido en la legislación europea (Sanco, 2011). De esta manera, en la tabla 1, se muestran los plaguicidas que están fuera de este criterio de aceptación.

ACN	ACN -ACÉTICO	ACN-FÓRMICO	ACN-AcOEt	AcOEt
Tiociclam	tiociclam	tiociclam	tiociclam	tiociclam
metomilo	tiodicarb	metomilo	acefato	acefato
tiodicarb	propamocarb	tiodicarb	clorfenapir	clorfenapir
propamocarb	dazomet	ometoato	metamidofos	metamidofos

dazomet	tridemorf	dazomet	tiodicarb	tiodicarb
metilmetsulfuron			propamocarb	propamocarb
tridemorf			dazomet	dinotefuran
			nitempiram	nitempiram
			metilmetsulfuron	ometoato
			tridemorf	dazomet
			ometoato	

Tabla 1. Plaguicidas con porcentajes de recuperación menores a 70% o mayores a 120%, obtenidos mediante el método QuEChERS citrato.

La tabla 1 muestra que el empleo del *buffer* de citrato y la adición de ácidos orgánicos permite obtener la recuperación de la mayoría de los plaguicidas evaluados, ya que solo cinco compuestos no cumplen con las condiciones establecidas por la legislación europea (Sanco, 2011). Esto implica que con las condiciones de pH alcanzadas por las mezclas citrato-ácido fórmico y citrato-ácido acético se obtienen las mejores condiciones para la extracción de los plaguicidas evaluados. La figura 3, indica algunos de los coeficientes de variación conseguidos por medio del empleo de cada uno de los ácidos orgánicos. En esta figura se puede observar que para utilizar ácido fórmico, en general se presentan valores de coeficientes de variación inferiores que al usar ácido acético, lo cual se traduce en un método más preciso.

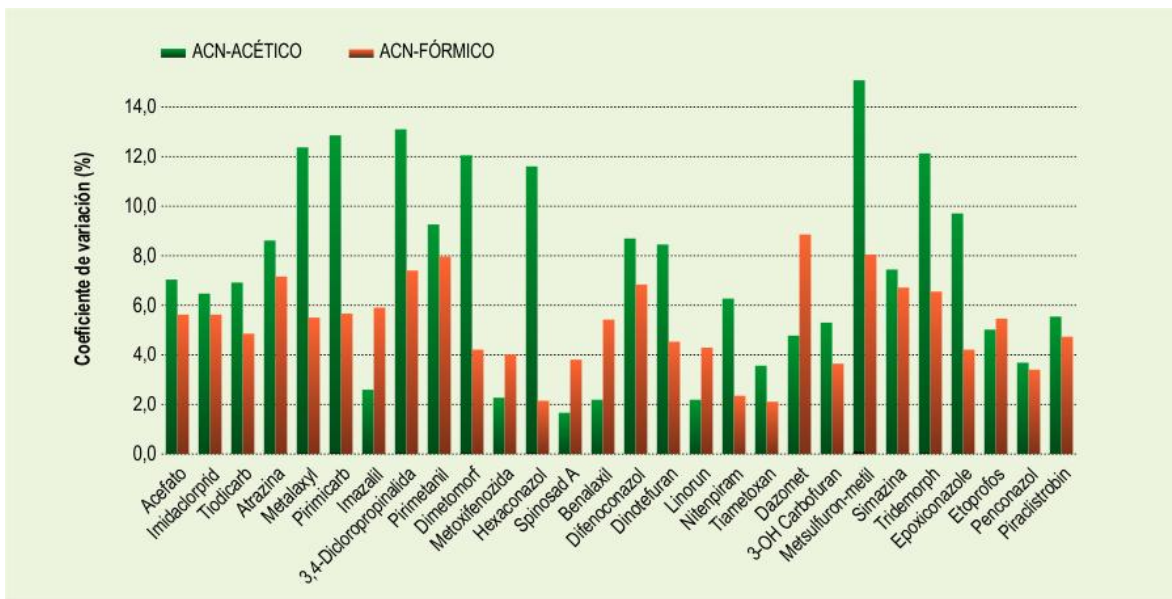


Figura 3. Coeficientes de variación obtenidos para algunos plaguicidas con el sistema citratos con ácido acético y ácido fórmico.

Para el caso de las tres primeras alternativas de extracción (acetonitrilo, acetonitrilo con ácido acético y acetonitrilo con ácido fórmico), se encontró que después de realizar la limpieza de los extractos, estos presentaron una leve coloración amarilla, sin embargo, no se observaron mayores diferencias entre dichas alternativas. Por su parte, para el caso de las fases extractantes en las que se incluyó el acetato de etilo, se halló que esta coloración era un poco más intensa, lo cual podría señalar una mayor presencia de compuestos de la matriz, pues ninguno de los plaguicidas presenta una coloración a las concentraciones a las que se trabaja. De acuerdo con la composición de la leche, la intensidad de esta coloración podría relacionarse directamente con la concentración de triglicéridos, vitaminas y fosfolípidos presentes en los extractos, lo que se explicaría por la menor constante dieléctrica del acetato de etilo que favorecería una mayor extracción de compuestos de naturaleza lipofílica y por lo tanto, una coloración más intensa en el extracto.

Ahora bien, para realizar el análisis cromatográfico de los extractos que contenían acetato de etilo, era necesario realizar un cambio de solvente a 100% acetonitrilo. En este cambio de solvente, se evidenció que al eliminar este mediante un flujo de nitrógeno, se formaba un precipitado que no se disolvía al adicionar el solvente para reconstituir (acetonitrilo); no obstante, después de filtrar previo a la inyección cromatográfica, se encontró que el extracto resultante no presentaba ninguna coloración, esto hace pensar que los interferentes mencionados con anterioridad precipitaron dando como resultado un extracto más limpio. En consonancia con estos resultados, se decidió hacer un estudio de efecto matriz para demostrar si esta precipitación lleva a una disminución de los interferentes.

Para estudiar el efecto matriz, se aplicó el proceso de extracción de manera normal a muestras de leche libres de plaguicidas, mediante cada una de las fases extractantes que se desean comparar, posteriormente previo al análisis cromatográfico, en el vial se fortificaron las muestras con los plaguicidas en estudio, con el propósito de comparar las respuestas cromatográficas obtenidas (con coextractantes) y las respuestas cromatográficas en solvente (sin coextractantes) a la misma concentración. La figura 4, revela los resultados de este experimento, en esta figura se presenta el promedio de porcentaje de efecto matriz de todos los compuestos; este porcentaje de efecto matriz, corresponde a la relación entre las áreas en extractos (con interferentes) con las áreas en solvente (sin interferentes).

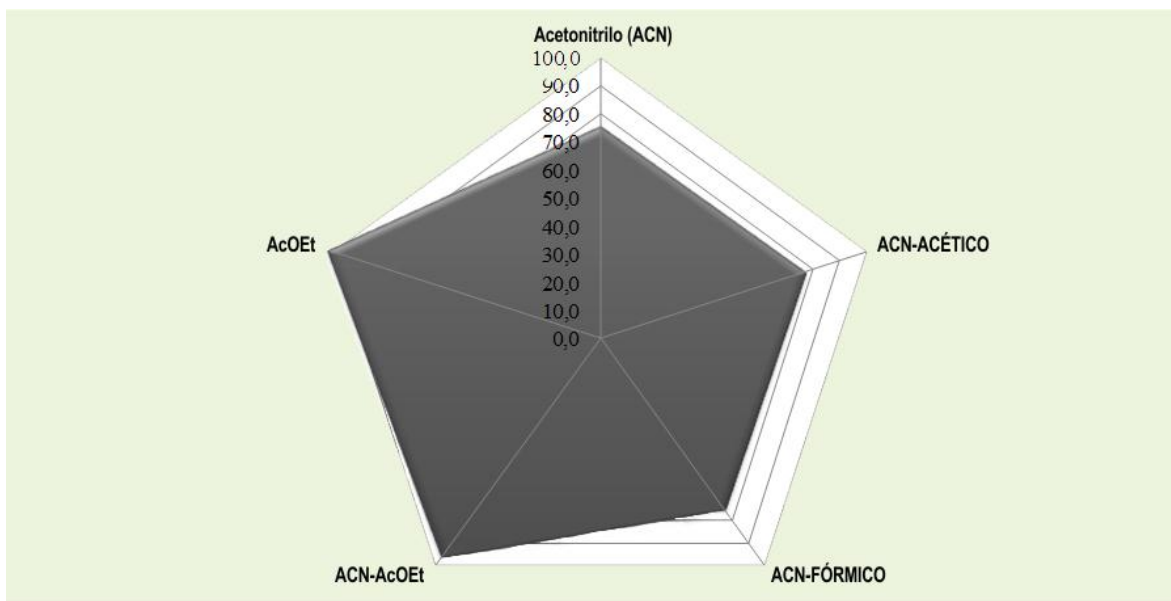


Figura 4. Porcentaje de efecto matriz obtenido a través de cada una de las fases extractantes.

El porcentaje de efecto matriz, indica tanto el tipo de efecto matriz que existe como el grado de este. Así, si este valor es mayor al 100%, el efecto matriz es de aumento de la señal cromatográfica, mientras que si es menor al 100% este efecto es supresión de la señal cromatográfica. Como se puede observar en esta figura, para las tres primeras fases extractantes (ACN, ACN-ACÉTICO y ACN-FÓRMICO) se presentan porcentajes de efecto matriz inferiores al 80%, esto indica que se da un fenómeno de supresión de la señal cromatográfica y que es bastante notorio, pues esta supresión es mayor del 20%. Este fenómeno de supresión de la señal cromatográfica, se lleva a cabo en el proceso de ionización de los plaguicidas en la interfaz y se cree ocurre principalmente por la presencia de compuestos de la matriz que compiten con los plaguicidas por los protones disponibles en el medio, lo cual se traduce en una menor cantidad de plaguicidas que adquieren carga en la interfaz y por lo tanto una menor respuesta cromatográfica (Ahumada, Zamudio y España, 2012).

Por otro lado, para las fases extractantes que contienen acetato de etilo se encuentra que el efecto matriz es prácticamente nulo, pues se tiene que el porcentaje de efecto matriz es prácticamente 100%. Estos resultados corroboran lo planteado acerca de la eliminación de interferentes mediante el cambio de solvente. Empero, este menor efecto matriz no solo es atribuido a la precipitación de algunos de los interferentes, sino también al tipo de interferentes que se pueden

extraer con el acetato de etilo, pues a diferencia del acetonitrilo este solvente no extrae los compuestos de alto momento dipolar, los cuales tienen una mayor probabilidad de generar fenómenos de supresión de la señal cromatográfica (Ahumada et al., 2012).

Finalmente, a pesar de que los resultados de precisión y exactitud revelaron que el empleo de acetato de etilo no es la mejor alternativa (figuras 1 y 2), los resultados de efecto matriz indican que en el proceso de detección es más conveniente el manejo de extractos obtenidos con acetato de etilo, lo que se traduce en una mayor capacidad de detección de residuos a bajas concentraciones.

Evaluación de la concentración de ácido fórmico

Como ya se discutió, la adición de ácido fórmico mejora la exactitud y la precisión en la extracción de algunos plaguicidas; además se ha reportado que esta adición aumenta la estabilidad de los plaguicidas en los extractos finales (Geis-Asteggiane, Lehotay y Heinzen, 2012). Los experimentos anteriores se realizaron a una concentración de ácido fórmico del 1% (V/V), seleccionada con fundamento en algunos reportes en la literatura (Walorczyk y Gnusowski, 2009). Sin embargo fue necesario establecer si esta concentración es la más adecuada para el presente estudio con base en la influencia de la concentración de ácido fórmico sobre la precisión y exactitud del método.

La tabla 1, muestra los resultados obtenidos de esta evaluación, donde se observa que al comparar los porcentajes de recuperación y los coeficientes de variación sin y con la adición de ácido fórmico (0,5%), se tiene que con la adición, para la mayoría de los casos, existe un aumento en la exactitud y la precisión de la metodología. Por ejemplo, para casos como metomilo, spinosad, tridemorf, diclorvos se tienen porcentajes de recuperación más cercanos a 100% con la suma del ácido fórmico, de igual manera para el caso de oxamilo, hexaconazol, ometoato y epoxiconazol se presenta una mejora en la precisión del método. Por otro lado, al comparar los resultados de 0,5% con los de 1%, se evidencia un leve descenso en los porcentajes de recuperación para algunos casos, al igual que una precisión más baja con el aumento de la concentración de ácido fórmico. Es de resaltar que para moléculas como metomilo y ometoato se consiguen porcentajes de recuperación adecuados (> 70%) al emplear la concentración más baja de ácido fórmico.

Al aumentar la concentración del ácido fórmico a 1,5% se encuentra que la recuperación de algunos compuestos desciende, al igual que su precisión. Inclusive en casos como metoxifenocida,

diclorvos y hexaconazol no se logran detectar estos compuestos, lo que sugiere que estas moléculas son bastante sensibles a la variación del pH.

Compuesto	0% CH ₂ O ₂	0,5% CH ₂ O ₂	1,0% CH ₂ O ₂	1,5% CH ₂ O ₂
Tiociclam	56,8 (2,5)	51,4 (36,3)	58,6 (20,1)	55,1 (3,9)
Monocrotofos	95,6 (5,8)	116,9 (6,5)	97,6 (7,6)	101,6 (8,5)
Oxamilo	97,9 (6,1)	93,7 (4,6)	103,5 (10,9)	113,1 (8,8)
Metomilo	67,0 (17,6)	76,1 (14,9)	53,2 (8,1)	100,7 (10,8)
Dimetoato	86,3 (7,5)	92,0 (4,3)	93,8 (9,4)	72,1 (8,7)
Cimoxanilo	92,0 (5,7)	105,3 (6,5)	111,3 (7,9)	177,6 (15,5)
Tiodicarb	46,3 (5,4)	41,9 (4,1)	40,4 (12,9)	89,0 (7,1)
Carbofuran	98,2 (5,2)	104,1 (4,0)	103,2 (6,8)	104,3 (9,3)
Metalaxyl	95,3 (6,2)	108,3 (5,9)	105,5 (6,9)	92,3 (9,8)
Pirimicarb	91,0 (5,3)	103,1 (5,8)	104,8 (6,2)	95,9 (8)
Imazalil	87,2 (5,3)	102,3 (5,7)	101,3 (8,8)	82,7 (7,3)
Pirimetanil	87,5 (9,5)	100,0 (9,9)	98,9 (11,5)	92,9 (12,1)
Dimetomorf	98,0 (5,8)	100,8 (6,1)	103,5 (8,1)	95,1 (5,5)
Azoxistrobina	97,9 (3,7)	102,8 (3,2)	104,3 (8,5)	86,8 (6,3)
Tebuconazole	85,3 (3,2)	104,3 (5,6)	110,1 (8,6)	114,6 (5,1)
Metoxifenocida	91,7 (4,4)	106,5 (5,9)	106,2 (6,6)	No Detectado
Hexaconazol	90,9 (8,6)	105,6 (6,3)	103,7 (11)	No Detectado
Spinosad	75,9 (7,4)	102,0 (7,9)	104,3 (7,1)	81,1 (8,9)
Benalaxil	95,9 (5)	106,2 (5,6)	105,7 (6,9)	92,0 (5,2)
Metilazinfos	93,9 (4,8)	102,3 (5,3)	73,4 (6,2)	58,5 (17,2)
Propamocarb	43,4 (7,9)	96,2 (3,9)	90,0 (6)	88,0 (5,5)
Ometoato	84,5 (8,9)	102,1 (5,6)	69,9 (7,6)	88,7 (8,1)
Dinotefuran	90,0 (2,3)	97,9 (2,2)	82,0 (7)	101,7 (8,1)
Nitenpiram	90,2 (3)	82,8 (14,3)	93,5 (11,5)	101,8 (9,7)
Tiametoxam	105,0 (5)	81,6 (11,6)	78,5 (22,1)	127,7 (8)
Dazomet	41,3 (33,8)	117,0 (5,5)	48,8 (5,5)	129,2 (11,8)
Diclorvos	No Detectado	88,2 (19,6)	67,6 (18,9)	No Detectado
Mevinphos	92,8 (5,4)	111,9 (4,9)	94,3 (6,3)	107,0 (13,0)
Tiacloprid	87,8 (12,3)	102,6 (2)	87,9 (5,9)	104,7 (8,9)
Metsulfuron-metil	62,0 (19,1)	103,7 (2,4)	87,3 (7)	98,4 (7,9)
Simazina	103,1 (6,8)	110,1 (3,6)	94,6 (6,4)	117,1 (8,8)
Isoprocarb	97,4 (6,8)	108,2 (4,8)	96,5 (7,5)	109,3 (10,7)
Ametrina	92,5 (4,0)	106,7 (3,3)	89,8 (6,9)	109,5 (8,8)
Tridemorph	35,2 (7,7)	103,4 (4,7)	95 (7,6)	97,7 (7,3)
Epoxiconazole	98,3 (9,3)	96,0 (4,2)	83,5 (6,7)	120,1 (9,1)
Etoprofos	97,6 (4)	105,5 (4,3)	92,4 (5,5)	107,4 (8,7)
Flusilazol	87,3 (6,1)	100,7 (3,6)	86 (6,6)	104,2 (5,9)
Pyraclostrobin	95,2 (4,2)	107,8 (5,0)	94,3 (5,8)	107,1 (9,3)
Trifloxistrobina	94,8 (5,8)	105,5 (3,3)	90,7 (5,7)	110,2 (10,3)
Lufenuron	81,5 (11,3)	98,3 (2,3)	86,5 (5)	104,4 (12,5)

Tabla 2. Porcentajes de recuperación y coeficientes de variación a diferentes concentraciones de ácido fórmico (CH₂O₂) para algunos de los plaguicidas.

Los resultados de estos experimentos, muestran que, en efecto, al agregar ácido fórmico mejora la precisión y exactitud del método, no obstante, al emplear concentraciones superiores al 0,5% se presenta un descenso en las recuperaciones de algunos compuestos. De esta manera, se establece que al utilizar una concentración de 0,5% de ácido fórmico se obtienen los mejores resultados, pues de la totalidad de los compuestos solo tiociclam y tiodicarb no cumplen con los criterios de aceptación de la Unión Europea (Sanco, 2011).

Efecto del ultrasonido

Respecto a tiociclam y tiodicarb, para las cuales no se logró obtener una recuperación adecuada, se tiene que estos resultados coinciden con trabajos previos que aplican QuEChERS para el análisis de estas moléculas en material vegetal (Ahumada y Zamudio, 2011). Por lo tanto, para alcanzar mejores porcentajes de recuperación, se procedió a asistir la extracción con ultrasonido, pues algunas investigaciones han reportado la mejora en la exactitud de estos compuestos (Ferrer et al., 2010). De esta manera, posterior a la agitación que se realiza después de la adición de las sales (citrato y sulfato de magnesio), se sometió la mezcla de extracción a cuatro diferentes tiempos de ultrasonido, los cuales correspondieron a 5 min, 10 min, 15 min y 20 min.

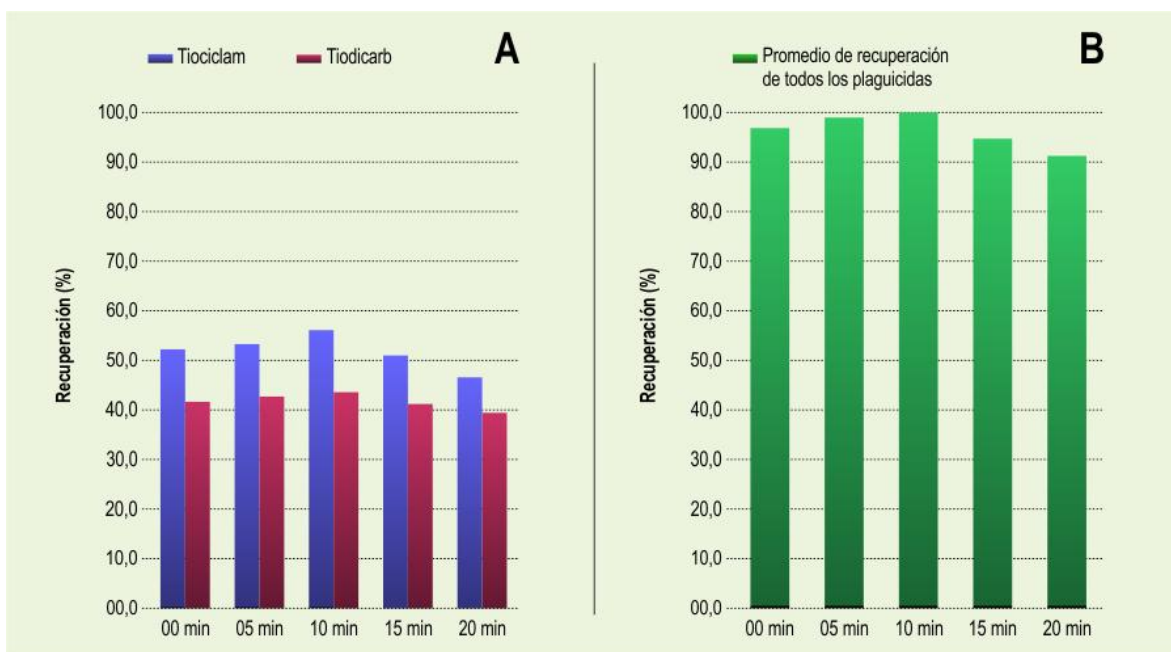


Figura 5. Efecto del ultrasonido sobre los porcentajes de recuperación.
A: recuperación de tiociclam y tiodicarb. B: promedio de recuperación de todos los plaguicidas.

La figura 5 A, revela que al aplicar los diferentes tiempos de ultrasonido no se mejora la recuperación de tiociclam y tiodicarb, lo cual se encuentra en desacuerdo con lo encontrado en otras investigaciones (Ferrer et al., 2010). En estas investigaciones, al aplicar ondas ultrasónicas se da básicamente una mejora en la transferencia de masa desde la fase sólida de la matriz hasta la fase extractante, para el caso específico de la leche, no existe una fase sólida significativa (respecto a frutas u otro tipo de alimentos), pues se trata de una emulsión y por consiguiente, la extracción de estos plaguicidas no aumenta de manera considerable, pues este efecto de transferencia de masa no existe. Lo anterior implica que la extracción es únicamente función de la constante de partición (matriz-fase extractante) y las ondas de ultrasonido no afectan el valor de esta constante.

Finalmente, la figura 5 B muestra que se tiene un leve aumento en los porcentajes de recuperación de los compuestos restantes al someter las muestras a 5 min y 10 min de ultrasonido, posteriormente al aplicar tiempos mayores se alcanzan menores porcentajes de recuperación, sin embargo, al realizar un análisis de varianza no se encontraron diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) para ninguno de los plaguicidas.

Conclusiones

En el estudio de las diferentes variables que afectan la extracción de residuos de plaguicidas en leche, se halló que al trabajar con el sistema de citratos para amortiguar el pH se consiguen mejores porcentajes de recuperación respecto al sistema acetato. Por otro lado, de los diferentes solventes o mezclas de solventes evaluados se determinó que la mejor opción es el empleo de acetonitrilo con ácido fórmico al 0,5%. Respecto al efecto de asistir el proceso de extracción con ultrasonido se tuvo que para ninguno de los plaguicidas se encontró alguna diferencia en la precisión y exactitud.

Finalmente, se desarrolló una metodología multiresiduo para el análisis de residuos de 56 plaguicidas en leche, con porcentajes de recuperación entre el 70,4% y 117% y coeficientes de variación entre el 2,0% y el 19,5%, lo cual señala que cumple con los criterios de aceptación de la Unión Europea para este tipo de análisis.

Agradecimientos

Expresamos nuestros agradecimientos al Centro de Biosistemas y a la Dirección de Investigación, Creatividad e Innovación de la Universidad Jorge Tadeo Lozano por su apoyo y financiación a través del proyecto 391-08-11 "Desarrollo de metodologías para la determinación de residuos de antibióticos de uso veterinario en productos lácteos".

Referencias

AHUMADA, D. A., y ZAMUDIO, A. M. 2011. «Analysis of pesticide residues in tomato using QuEChERS sample preparation and ultra fast liquid chromatography coupled to mass spectrometry». En: *Revista Colombiana de Química*, 40, pp. 227-246.

AHUMADA, D. A., ZAMUDIO, A. M., y ESPAÑA, J. C. 2012. «Matrix effect in pesticide analysis by ultra fast liquid chromatography coupled to mass spectrometry». En: *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23, pp. 661-669.

ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S. J., Å TAJNBAHER, D., y SCHENCK, F. J. 2003. «Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce». En: *Journal Of AOAC International*, 86, pp. 412-431.

CHEN, S., YU, X., HE, X., XIE, D., FAN, Y., y PENG, J. 2009. «Simplified pesticide multiresidues analysis in fish by low-temperature cleanup and solid-phase extraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry». En: *Food Chemistry*, 113, pp. 1297-1300.

CHUNG, S. W. C., y CHEN, B. L. S. 2011. «Determination of organochlorine pesticide residues in fatty foods: a critical review on the analytical methods and their testing capabilities». En: *Journal of Chromatography A* 1218, pp. 5555-5567.

CLEMENS, R. A., HERNELL, O., y MICHAELSEN, K. F. 2011. «Milk and milk products in human nutrition». En: Nestlé Nutrition Institute Workshop Series, 67 S. Disponible en: <http://content.karger.com/ProdukteDB/produkte.asp?Aktion=showproducts&searchWhat=books&searchParm=toc&ProduktNr=254518>

DE BRABANDER, H. F., NOPPE, H., VERHEYDEN, K., VANDEN BUSSCHE, J., WILLE, K., OKERMAN, L., VANHAECKE, L., REYBROECK, W., OOGHE, S., y CROUBELS, S. 2009. «Residue analysis: future trends from a historical perspective». En: *Journal of Chromatography, A* 1216, pp. 7964-7976.

DECKER, G. 1959. «Significance of pesticide residues in milk and meat». En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7, pp. 681-683.

ENGLER, A., NAHUELHUAL, L., COFRÉ, G., y BARRENA, J. 2012. «How far from harmonization are sanitary, phytosanitary and quality-related standards? An exporter's perception approach». En: *Food Policy*, 37, pp. 162-170.

FERRER, C., MEZCUA, M., MARTÍNEZ-UROZ, M., PAREJA, L., LOZANO, A., y FERNÁNDEZ-ALBA, A., 2010. «Method development and validation for determination of thiosultap sodium, thiocyclam, and nereistoxin in pepper matrix». En: *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398, pp. 2299-2306.

FILIGENZI, M. S., EHRKE, N., ASTON, L. S., y POPPENGA, R. H. 2011. « Evaluation of a rapid screening method for chemical contaminants of concern in four food-related matrices using QuEChERS extraction, UHPLC and high resolution mass spectrometry». En: *Food Additives & Contaminants: Part A* 28, pp. 1324-1339.

GEIS-ASTEGGIANTE, L., LEHOTAY, S. J., y HEINZEN, H. 2012. «Effects of temperature and purity of magnesium sulfate during extraction of pesticide residues using the QuEChERS method». En: *Journal Of AOAC International*, 95, pp. 1311-1318.

GILBERT-LÓPEZ, B., GARCÍA-REYES, J. F., y MOLINA-DÍAZ, A. 2009. «Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: a review». En: *Talanta*, 79, p. 109.

HEFNAWY, M. 2011. «Advances in food protection: focus on food safety and defense» (1st ed.). En: *Springer*, XIV (254), p. 56.

INGRAM, J. 2011. «A food systems approach to researching food security and its interactions with global environmental change». En: *Food Security*, pp. 1-15.

JEONG, I. S., KWAK, B. M., AHN, J. H., y JEONG, S. H. 2012. «Determination of pesticide residues in milk using a QuEChERS-based method developed by response surface methodology». En: *Food Chemistry*, 133, pp. 473-481.

JIN, M., SHAO, H., JIN, F., GUI, W., SHI, X., WANG, J., y ZHU, G. 2012. «Enhanced competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for the trace detection of insecticide triazophos». En: *Journal of Food Science*, 77(5), pp. T99-T104.

JOINT, F. 2011. «Evaluation of certain contaminants in food: seventy-second [72nd] report of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives». Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/trs/who_trs_959_eng.pdf

KAMPIRE, E., KIREMIRE, B. T., NYANZI, S. A., y KISHIMBA, M. 2011. «Organochlorine pesticide in fresh and pasteurized cow's milk from Kampala markets». En: *Chemosphere*, 84, pp. 923-927.

LEDoux, M. 2011. «Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades». En: *Journal of Chromatography A* 1218, pp. 1021-1036.

LEHOTAY, S. J., SON, K., KWON, H., KOESUKWIWAT, U., FU, W., MASTOVSKA, K., HOH, E., y LEEPIPATIBOON, N. 2010. «Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables». En: *Journal of Chromatography A* 1217, pp. 2548-2560.

MARTÍNEZ, J. L., PLAZA-BOLAÑOS, P., ROMERO-GONZÁLEZ, R., y GARRIDO, A. 2009. «Determination of pesticide transformation products: A review of extraction and detection methods». En: *Journal of Chromatography A* 1216, pp. 6767-6788.

MEZCUA, M., REPETTI, M. R., AGÜERA, A., FERRER, C., GARCÍA-REYES, J. F., y FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. 2007. «Determination of pesticides in milk-based infant formulas by pressurized liquid extraction followed by gas chromatography tandem mass spectrometry». En: *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 389, pp. 1833-1840.

MISHRA, R. K., DOMÍNGUEZ, R. B., BHAND, S., MUÑOZ, R., y MARTY, J. L. 2011. «A novel automated flow-based biosensor for the determination of organophosphate pesticides in milk». En: *Biosensors and Bioelectronics*, 32(1), pp. 56-61.

PIZZUTTI, I. R., DE KOK, A., HIEMSTRA, M., WICKERT, C., y PRESTES, O. D. 2009. «Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry». En: *Journal of Chromatography A* 1216, pp. 4539-4552.

ROUVIÈRE, F., BULETÉ, A., CREN-OLIVÉ, C., y ARNAUDGUILHEM, C. 2012. «Multiresidue analysis of aromatic organochlorines in soil by gas chromatography-mass spectrometry and QuEChERS extraction based on water/dichloromethane partitioning. Comparison with accelerated solvent extraction». En: *Talanta*, 93, pp. 336-344.

SANCO. 2011. *Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. Consumers (Bruselas). Disponible en:
http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/docs/qualcontrol_en.pdf

WALORCZYK, S., y GNUSOWSKI, B. 2009. «Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in honeybees using acetonitrile-based extraction and gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry». En: *Journal of Chromatography A* 1216, pp. 6522-6531.

ZWEIGENBAUM, J. 2011. «United States and Japanese food regulations». En: *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ)*, 747, pp. 53-63.