

## DESARROLLO DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR GC-FPD EN UN CANDIDATO A MATERIAL DE REFERENCIA DE ACEFATO Y METAMIDOFOS EN AGUACATE.

Ramírez Flores DG<sup>a</sup>, Avila Calderón MA<sup>b\*</sup>, Villaseñor Ortega F<sup>a</sup>, Arce Osuna M<sup>b</sup>.

<sup>a</sup> Instituto Tecnológico de Celaya, Dpto. de Ingeniería Bioquímica, Av. Tecnológico s/n, colonia FOVISSSTE C.P. 38010, Celaya, Guanajuato, México.

<sup>b</sup> Centro Nacional de Metrología, Dirección de Análisis Orgánicos, Carretera a Los Cués, km 4.5, C.P. 76246, El Marqués, Querétaro, México. [\\*aavila@cenam.mx](mailto:*aavila@cenam.mx)

### RESUMEN

Adaptando un método de extracción para matriz compleja, se obtuvieron extractos de un Candidato a Material de Referencia de plaguicidas en aguacate liofilizado, el cual contiene acefato y metamidofos.

Para la obtención de estos extractos se probaron varios métodos, encontrando que al hacer una extracción con acetonitrilo acidificado al 1% y agua desionizada, seguida de una segunda extracción solo con acetonitrilo obtenemos una recuperación cercana al 100%, y al emplear una mezcla de sorbentes para la etapa de limpieza se minimiza la coelución de interferencias grasas en el extracto obteniendo una buena recuperación de los analitos. En la parte del análisis de los extractos se utilizó un cromatógrafo de gases con detector fotométrico de flama (GC-FPD), esto por su selectividad con los compuestos organofosforados, obteniendo una buena separación y definición de los compuestos, lo que nos permitió hacer un cálculo preliminar de la concentración de plaguicidas presentes en la muestra.

### ABSTRACT

Adapting an extraction method for complex matrix, extracts of a Candidate Reference Material pesticide lyophilized avocado, which contains acephate and methamidophos were obtained.

For obtaining these extracts were tested several methods and found that by making an acidified extraction with 1% acetonitrile and deionized water, followed by a second extraction with acetonitrile only obtain a recovery of nearly 100%, and to employ a mixture of sorbents in cleaning stage the fat coelution interference is minimized in the extract to obtain a good recovery of the analytes. In the analysis of the extracts a gas chromatograph was used with a flame photometric detector (GC-FPD), this by they selectivity with organophosphorus compounds, obtaining a good separation and definition of the compounds, which allowed us to make a preliminary estimate of the concentration of pesticides in the sample.

**Palabras clave:** Análisis, Plaguicidas, Aguacate.

**Área:** Frutas y Hortalizas.

### INTRODUCCIÓN

México es el principal productor de aguacate a nivel mundial (SIAP, 2013) como todo fruto, es susceptible a plagas y enfermedades que pueden llegar a mermar los niveles de producción, para combatir y/o evitar esto, los productores hacen uso de diversos plaguicidas, sin embargo existen normatividades que especifican los límites máximos residuales (LMR) que pueden presentar, aspecto que se debe tener

presente al comercializar con otros países. Un ejemplo de esto es el caso de Japón, el segundo país importador de aguacate mexicano, el cual en 2011 reportó 23 casos de violaciones a los límites de residuos de plaguicidas en aguacate, siendo la causa la presencia de acefato y metamidofos, los cuales son compuestos organofosforados que exhiben una alta toxicidad para el ser humano. Una de las acciones empleadas para solucionar y evitar estos rechazos consiste en el establecimiento de referencias confiables, para fortalecer así a todos los miembros del sector. Para establecer estas referencias se emplean métodos validados de extracción y cuantificación.

Para la extracción de los plaguicidas presentes en alimentos lo primero es hacer una extracción sólido-líquido, para esto los distintos métodos propuestos utilizan mezclas muy variadas de disolventes, dependiendo por ejemplo del contenido graso de la matriz (Sampedro, 1998), sin embargo, esta extracción pudiera arrastrar algunos compuestos indeseados, por lo que es necesaria una etapa de limpieza o purificación del extracto. Anastassiades y col en 2003 desarrollan un método de extracción simple para muestras de alimentos conocido como QuEChERS, por sus siglas en inglés, el cual se basa en una extracción del analito usando MeCN y una sal, seguida de una etapa de limpieza dispersiva en fase sólida para remover las interferencias para su posterior análisis por cromatografía, este método ha probado ser exitoso para la detección de diversos plaguicidas en muestras con alto contenido graso usando LC-MS/MS y GC-MS/MS para su análisis (Chamkasem *et al*, 2013); en este trabajo se planteó una modificación del método reportado con la finalidad de aprovechar la capacidad de eliminación de interferencias de la muestra para así asegurar la correcta medición de los plaguicidas; el análisis de los extractos se hizo con un cromatógrafo de gases equipado con un detector fotométrico de llama (FPD), el cual es específico para compuestos que contienen fósforo y azufre en su molécula (Balasubramanian, 1999; Bicchi, 1997). El objetivo de este trabajo es desarrollar una metodología sencilla de extracción que minimice las interferencias de matriz a la hora del análisis y que dé como resultado una buena recuperación de los plaguicidas, también se busca optimizar el método de cuantificación del GC-FPD para obtener la mejor definición de los picos característicos de los compuestos y así poder cuantificar con certeza la concentración de acefato y metamidofos presente en el Candidato a Material de Referencia de plaguicidas en aguacate.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Reactivos**

Se utilizaron estándares analíticos de acefato, metamidofos y dimetoato, marca Accu Standards, para preparar las disoluciones madre con las que se adicionaron las muestras de aguacate libre de plaguicidas. El acetonitrilo grado HPLC, el ácido acético, el hexano y el cloruro de sodio usado en la extracción fueron marca J.T. Baker, Para la etapa de limpieza del extracto se emplearon tubos de limpieza dispersiva QuEChERS marca Agilent, que contienen sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>), amina primaria-secundaria (PSA) y C18. Las muestras se tomaron de un Candidato a Material de Referencia de plaguicidas en aguacate liofilizado y la muestra utilizada

como blanco de matriz de un Candidato a Material de Referencia de aguacate libre de plaguicidas liofilizado.

### **Equipos**

Para el proceso de extracción se usó un homogeneizador de tejidos marca OMNI International modelo GLH, una centrifuga marca eppendorf modelo 5804 R, un evaporador de nitrógeno marca Organomation Associates, Inc y para el análisis de los extractos se usó un Cromatógrafo de Gases marca Agilent, modelo GC System 7890<sup>a</sup> con Detector Fotométrico de Flama (GC-FPD).

### **Procedimiento de extracción**

Se tomaron muestras de un candidato a material de referencia de aguacate liofilizado libre de plaguicidas para obtener el perfil de la matriz y para las pruebas de adición de patrón en matriz se prepararon dos curvas de calibración, una de acefato con tres niveles, 800, 1500 y 2500 ng/g, y otra con tres niveles de metamidofos, 5500, 6500 y 7500 ng/g, como la cuantificación de los plaguicidas se basó en el método de Estándar Interno se adicionó una concentración única de dimetoato (1000 ng/g) a todos los niveles. Para la obtención del extracto se pesaron 1g de muestra en un tubo de centrifuga de 50 mL, se le adicionaron 15 mL de acetonitrilo acidificado al 1% y 5 mL de agua desionizada, se deja reposar 30 min. Se lleva al homogeneizador de tejidos por 1 min, se pasa al sonicador por 10 min para después centrifugar a 5000 rpm por 15 min a 4°C, se decanta el sobrenadante en otro tubo de centrifuga, para asegurar la completa extracción de los analitos de la matriz se hace una re-extracción adicionando 10 mL de acetonitrilo al sedimento, homogeneizando de nuevo por 1 min y se centrifuga para mezclar el sobrenadante con el de la primera extracción y a esto se le agrega 1g de NaCl, se agita en vortex por 1min y se deja reposar hasta que se separen las dos fases. Se toma la fase orgánica y se le agrega el tubo de limpieza dispersiva, se agita en vortex por 1min y se centrifuga a 5000 rpm por 15min a 4°C, el líquido sobrenadante se evapora a sequedad para después reconstituir el extracto en una mezcla de hexano-acetona (1:1), esto se transfiere a un vial ámbar y se inyecta en el GC-FPD.

### **Condiciones de medición**

Se empleó un Cromatógrafo de gases Marca Agilent, modelo GC System 7890A con detector fotométrico de flama (FPD) y una columna HP-5 (30 m x 320 µm x 0.25 µm) Agilent. Las condiciones del equipo: inyector 250°C, Temperatura horno 60°C, Rampa de temperaturas: 60 °C (1 min), 20 °C/min hasta 228 °C (0.5 min), 5 °C/min hasta 280 °C (2 min), volumen de inyección 2µL en modo splitless, Helio como gas acarreador a un flujo de 5mL/min, para el detector un flujo de H<sub>2</sub> de 70mL/min y de Aire 100mL/min.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Optimización de la extracción**

Para la etapa de limpieza se utilizó cartuchos amino ( $-NH_2$ ), los cuales son empleados como adsorbente polar, sin embargo se podían observar las gotas de grasa en las paredes del tubo en donde se concentró el extracto; en otra de las pruebas se emplearon cartuchos ciano (CN), los cuales son utilizados en la extracción de compuestos polares, en este método el extracto tiene menos color que el obtenido con los cartuchos amino, pero sigue presentando un gran contenido de grasa, debido a estas observaciones se decidió probar con un tubo de limpieza dispersiva de QuEChERS, ya que su contenido de  $MgSO_4$  ayuda a eliminar los remanentes de agua del extracto, la PSA sirve para la eliminación de pigmentos polares y azúcares, y el C18 para la eliminación de grasas, lípidos y componentes no polares, como se muestra en la Fig. 1 los sorbentes retienen estas interferencias y se obtiene un extracto más claro; se probó que con el uso de acetonitrilo acidificado más agua desionizada en la primera extracción y solo acetonitrilo en la re-extracción, con esto se recupera casi la totalidad de los analitos, esto se corroboró haciendo tres extracciones a una misma muestra como se observa en la tabla 1.

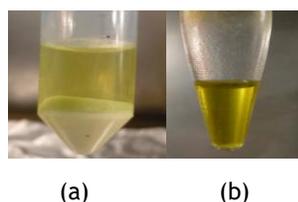


Figura 1. a) Etapa de limpieza del extracto, b) extracto final.

Tabla I. Porcentajes de recuperación.

	Blanco adicionado	
	área	%
1a extracción	457.4	92.16199879
2a extracción	38.9	7.838001209
3a extracción	0	0
	496.3	100

Para la identificación inicial de los compuestos se inyectaron las disoluciones madre de acefato, metamidofos y dimetoato, en la Fig. 2 se muestran los cromatogramas obtenidos.

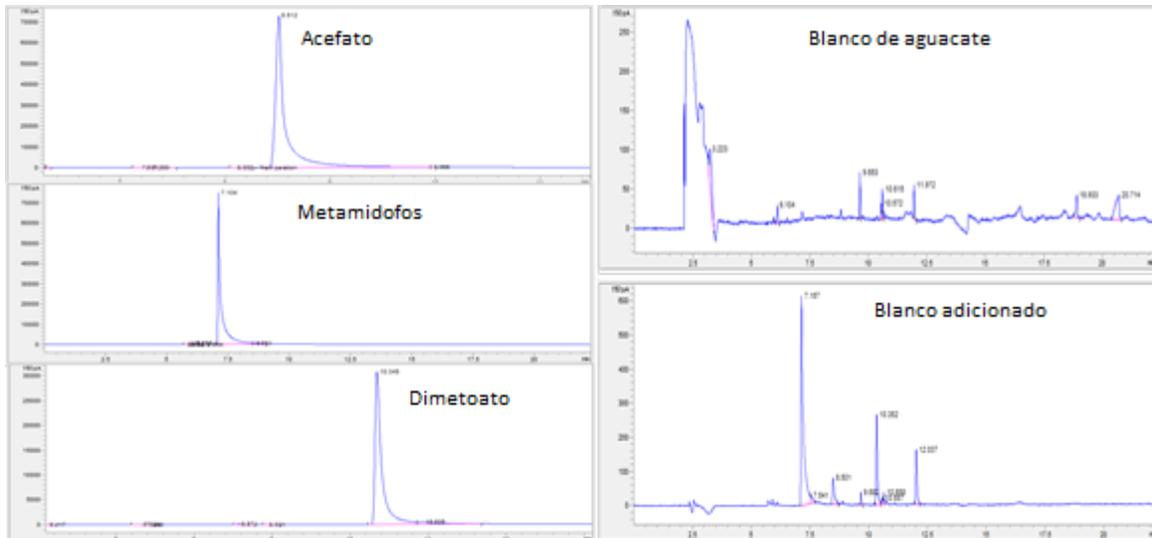


Figura 2. Cromatogramas de las disoluciones madre de acefate, metamidofos y dimetoato; perfil de matriz de aguacate libre de plaguicidas; blanco adicionado con acefate (2500 ng/g), metamidofos (7500 ng/g) y dimetoato (1000 ng/g).

En la Fig. 2 se muestra el cromatograma del perfil de matriz obtenido de la inyección de la muestra blanco de aguacate, el cual muestra muy pocas interferencias, lo que nos permitirá identificar y cuantificar los plaguicidas de interés en la muestra, también se ve un ejemplo de los cromatogramas obtenidos de los blancos adicionados, se puede apreciar que en el minuto 7.157 aparece el pico de metamidofos, en 8.501 aparece acefate y en 10.352 el dimetoato. Las muestras del Candidato a Material de Referencia de plaguicidas en aguacate se adicionaron con dimetoato como Estándar Interno (**Fig. 3**).

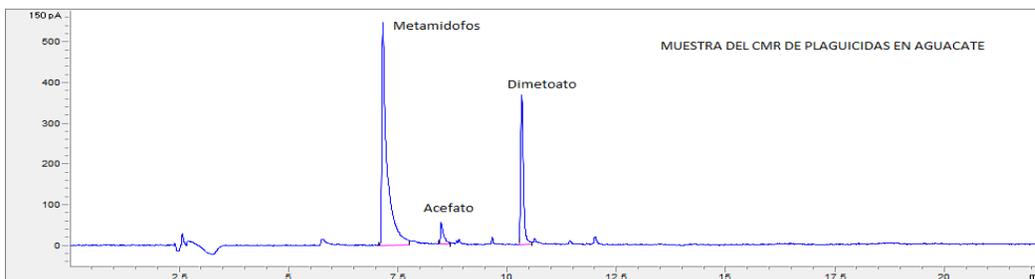


Figura 3. Cromatograma de una muestra del Candidato a Material de Referencia de plaguicidas en aguacate liofilizado.

Se encontró que la muestra tiene una concentración promedio de acefate de 1600 ng/g y de metamidofos de 7600 ng/g, en la Fig. 4 las líneas punteadas muestran la desviación estándar de la dispersión en las mediciones de tres muestras, cada una analizadas por triplicado.

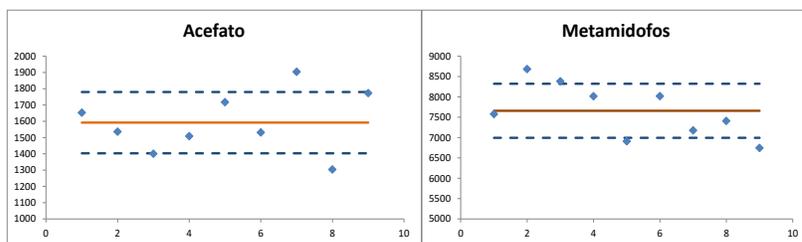


Figura 4. Desviación estándar de la dispersión de las concentraciones de acefato y metamidofos de las muestras.

Aunque el aguacate es una matriz compleja de analizar, debido principalmente a su alto contenido de grasas, con los resultados obtenidos podemos concluir que el método de extracción es eficiente, pues con el uso de los sorbentes se retienen la mayor parte de las interferencias grasas mientras nos permite tener una buena recuperación de los analitos. El método de análisis por GC-FPD mostró ser el adecuado, pues tenemos una buena separación de los compuestos, así como una buena definición de los mismos, a diferencia de los obtenidos con los primeros métodos probados, en donde los picos salían deformados o enmascarados por interferencias del extracto, el tener ya establecidos estos métodos nos permitirá hacer la cuantificación del contenido de acefato y metamidofos en el Candidato a Material de Referencia de plaguicidas en aguacate.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. 2003. Fast and easy multiresidue method employing MeCN extraction/ partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC* 86:412–431.
- Chamkasem N, Ollis LW, Harmon T, Lee S, Mercer G. 2013. Analysis of 136 pesticides in avocado using a modified QuEChERS method with LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 2315-2329
- Sampedro MC, Gómez de Balugera Z, Goicolea A, Barrio RJ (1998) Determination of the insecticide pyridafenthion in river water, soils and wine by adsorptive stripping voltammetry. *Food Add Contam* 15: 793-800.
- SIAP. (08 de 2013). Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. (SAGARPA) Recuperado el 10 de 09 de 2013, de [http://w6.siap.gob.mx/comercio/con\\_producto.php](http://w6.siap.gob.mx/comercio/con_producto.php)