

## Implementación de la metodología QuEChERS en el análisis de residuos de plaguicidas en maíz blanco (*Zea mays*)

### Implementation of the methodology QuEChERS in the residual pesticide analysis in white corn (*Zea mays*)

Martha I. Páez<sup>1\*</sup>, Jina M. Martínez<sup>2</sup>.

Recibido para publicación: Julio 27 de 2015 – Aceptado para publicación: Noviembre 27 de 2015

#### RESUMEN

Las aplicaciones de plaguicidas en cultivos de maíz durante y posterior a su cosecha constituyen un serio riesgo para la salud y el medio ambiente si su prevalencia continúa durante su línea de consumo, por consiguiente, la determinación adecuada de los residuos de este tipo de sustancias es de gran interés para minimizar el impacto negativo de los plaguicidas en la salud y calidad de los productos agrícolas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la metodología de extracción multiresidual QuEChERS (“Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe”) como alternativa económica y de fácil implementación para el análisis de nueve plaguicidas en maíz blanco harinoso (*Zea mays*). Se ensayaron dos variantes de este método, el método original no bufferado y la versión oficial AOAC 2007.01 con buffer acetato; los análisis se llevaron a cabo por cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC-ECD). Se comparó el porcentaje de coextractivos, humedad en el extracto final y se realizó una verificación en términos de precisión, linealidad, exactitud, efecto matriz y sensibilidad. La implementación del método original permitió obtener extractos más limpios y porcentajes de recuperación más consistentes y apropiados (promedio general entre 71,4-111,6% con coeficientes de variación inferiores al 9,2%), linealidad ( $r > 0,9892$ ) y límites de detección y cuantificación inferiores a los límites máximos de residuos establecidos por la Comisión Europea (entre 10 y 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), lo que hace a este método una buena opción para cuantificar rutinariamente la residualidad de los plaguicidas evaluados en la matriz de trabajo.

**Palabras clave:** Plaguicidas, extracción multiresiduo, maíz, QuEChERS, GC-ECD.

#### ABSTRACT

The use of pesticides on maize crops during and after harvest constitutes a serious health and environmental risk if its prevalence remains during the consumption line. Therefore, the proper determination of the residues of such substances is critical for minimizing the negative impact of pesticides on health and quality of agricultural products. The aim of this study was to evaluate the multiresidual extraction methodology QuEChERS (“Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe”) as an economic alternative with easy implementation for the analysis of 10 pesticides in floury white corn (*Zea mays*). Two variants of this method were tested: the original non-buffered method and the official method AOAC 2007.01 with acetate buffer. Analyzes were carried out by gas chromatography with electron capture detector (GC-ECD). Co-extractives percentage and moisture in the final extract were compared, and a check in terms of accuracy, linearity, accuracy, and sensitivity matrix effect was made. Implementation of the original method permitted to obtain cleaner extracts and more consistent and appropriate (overall average between 71,4 – 111,6% with coefficients of variation less than 9,2%) recovery percentages. Additionally, linearity ( $r > 0,9892$ ) and limits of detection and quantification below the maximum residue limits established by the European Commission (10 to 50  $\text{mg kg}^{-1}$ ) were also obtained, which makes this method a good choice to routinely quantify the residual effect of the assessed pesticides in the matrix of work.

**Key words:** Pesticides, multiresidue extraction, corn, QuEChERS, GC-ECD.

<sup>1\*</sup> Licenciado en Química, Ph.D. Profesor titular. Grupo GICAMP, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Calle 13 No. 100-00, Cali, Colombia. Teléfono (2) 321 2100, Fax (2) 339 3248; correo electrónico: martha.paez@correounivalle.edu.co

<sup>2</sup> Química, Estudiante de maestría. Grupo GICAMP, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Calle 13 No. 100-00, Cali, Colombia. Teléfono (2) 321 2100, Fax (2) 339 3248, jina.martinez@correounivalle.edu.co

## INTRODUCCIÓN

El Maíz (*Zea mays*) es uno de los cereales de mayor cultivo en el mundo junto con el arroz y el trigo (Nuss y Tanumihardjo 2010). En 2014, la producción de maíz alcanzó los 851 millones de toneladas entre los primeros nueve productores del mundo, Estados Unidos, China, Brasil, La Unión Europea, Ucrania, Argentina, México, India y Canadá (USDA/FAS 2014).

De acuerdo con la constitución del grano, se pueden encontrar diferentes variedades de maíz (por ej., el maíz cristalino o fino (*Zea mays*, var *indurata*), el maíz dentado (*Zea mays*, var *identata*), el maíz dulce (*Zea mays*, var *saccharata*), el maíz harinoso (*Zea mays*, var *amylace*), entre otros. En particular, el maíz harinoso es esencialmente usado en la alimentación humana ya que sus granos contienen una elevada cantidad de almidón suave y blanco. Esta variedad de maíz se cultiva principalmente en Colombia, Perú y Bolivia (FAO 2001).

Por otro lado, el nivel de residualidad de plaguicidas en alimentos, es actualmente una de las principales preocupaciones de la comunidad científica, pues la toxicidad, bioacumulación y su elevado consumo en la producción agrícola, son las razones por las cuales el control de sus contenidos residuales en los alimentos es de carácter prioritario (Turiel y Martín-Esteban 2008). Así, los límites máximos de residuos de plaguicidas establecidos por la Comunidad Europea en el maíz están en el orden de 10 ppb (European Commission 2015), por tanto, al ser tan bajas las concentraciones permitidas, se hace necesario la implementación de metodologías altamente eficaces y reproducibles para la determinación de este tipo de sustancias.

En el contexto previamente expuesto, se desarrolló una metodología de extracción que involucra especialmente el pre-tratamiento de

la muestra, que ha sido denominado QuEChERS (“Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe”), acrónimo que hace referencia a sus principales ventajas: rápido, sencillo, barato, eficaz, robusto y seguro para la extracción de una amplia gama de plaguicidas en matrices de frutas y verduras con un alto porcentaje de humedad (Anastassiades et al. 2003).

Los métodos tradicionales para la determinación del residuo de plaguicidas en alimentos requieren de múltiples pasos, mayor cantidad de muestra, tiempo, mano de obra excesiva, gran cantidad de solventes. Además, no siempre se logra la determinación de plaguicidas de diferentes clases necesitando múltiples análisis de una sola muestra, por tanto, estos métodos generalmente resultan más complicados y presentan más fuentes potenciales de errores sistemáticos y aleatorios.

Por otro lado, QuEChERS, utiliza menor cantidad de muestra, en menos de 30 minutos el analista es capaz de realizar dos o más extracciones al tiempo, no se requiere gran cantidad de material de vidrio y la cantidad de pasos de extracción se disminuye; un amplio espectro de plaguicidas ha sido analizado usando QuEChERS, incluyendo plaguicidas no-polares, polares y planares (Anastassiades et al. 2003; Lehotay et al. 2005; AOAC 2007; Mastovska et al. 2010; Lehotay et al. 2010; Koesukwiwat et al. 2010; Chen et al. 2011; Cieslik et al. 2011).

En términos generales, la metodología QuEChERS ha sido validada para una gran cantidad de frutas y vegetales de diferentes características, mostrando resultados bastante favorables para ser utilizados en el análisis de plaguicidas en laboratorios de rutina, lo que lo hace un método atractivo para su implementación. A partir del método original se han desarrollado diversas modificaciones basadas en el uso de disoluciones tamponadas para mejorar la eficacia de la extracción de

compuestos dependientes del pH, tal es el caso del método 2007.01, validado por Lehotay ante la AOAC, y denominado "2007.01 Method: Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate" (AOAC 2007). En este método se utiliza acetonitrilo con un 1% en ácido acético para formar un tampón con acetato de sodio, lográndose obtener un pH alrededor de 4,5 y se elimina la adición de NaCl.

Otra modificación del método QuEChERS 2003 fue realizada por Anastassiades y se validó por la European Committee for standardization (CEN) como el método estándar EN 15662, en donde se utilizó buffers citrato (BS EN 15662:2008 2008). Sin embargo, para la variedad de maíz harinoso y el conjunto total de plaguicidas analizados en el presente estudio, cinco organofosforados (OPs) y cuatro organoclorados (OCs), no existen reportes previos de su evaluación e implementación mediante la técnica de Cromatografía de Gases con Detector de Captura de Electrones (GC-ECD). Dentro de los plaguicidas de estudio se encuentra el Clorpirifos, un compuesto de uso generalizado en el cultivo de maíz; adicionalmente se incluyó el análisis de plaguicidas como el  $\alpha$ -BHC, Endosulfán I-II, Dieldrín y Endrín, compuestos organoclorados que han sido prohibidos por su toxicidad cuyo análisis se hace importante por su elevada persistencia en el medio ambiente.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la metodología de extracción multiresidual QuEChERS como una alternativa económica y de fácil implementación para el análisis de 9 plaguicidas en maíz blanco harinoso (*Zea mays var amylace*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Caracterización del maíz blanco

El porcentaje de humedad se realizó según la Norma Técnica Colombiana NTC 2227

(ICONTEC 2003); para ello, el maíz fue sometido a un pre-acondicionamiento con posterior molienda y desecación. El cálculo de la humedad se realizó teniendo en cuenta el peso de una muestra de prueba inicial y el peso del maíz seco. El porcentaje de grasa se realizó mediante una extracción en soxhlet, utilizando 50 mL de la mezcla cloroformo-metanol (2:1) pesando 3,0 g de muestra. El contenido de N, H y C se realizó mediante análisis elemental al maíz seco y triturado utilizando un equipo de análisis elemental Thermo Electron Corporation.

### Método de extracción

La preparación de la muestra consistió en un proceso de acondicionamiento con el fin de alcanzar la humedad requerida por el método de extracción (70 - 90%). Las muestras de maíz fueron homogenizadas agregando 30 mL de agua por cada 50 g de muestra. El homogenizado se almacenó en recipientes plásticos a menos 4 °C. Posteriormente se llevó a cabo una etapa de extracción-particionamiento. En esta etapa, dos versiones del método QuEChERS se implementaron: el método original no bufferado (Anastassiades y Lehotay 2003) y el método oficial AOAC 2007.01 (AOAC 2007). El primer método incluyó la extracción de 10,0 g de muestra homogenizada con 10 mL de acetonitrilo (ACN), adicionando 4,6 g de  $MgSO_4 \cdot H_2O$  y 1,0 g de NaCl con posterior agitación. Para el segundo método, se usó el kit de extracción QuEChERS AOAC 2007.01 (5982-5755 Agilent) para 15,0 g de muestra, dotado de 50 tubos de polipropileno de 50.0 mL, 50 paquetes con 6,0 g  $MgSO_4$  y 1,5 g de acetato de sodio (NaAc) cada uno, como solvente de extracción en éste caso se usaron 15,0 mL de ACN con un 1% de ácido acético.

### Método de limpieza

Para la limpieza de los extractos se usó la extracción en fase sólida dispersiva (Dispersive solid phase extraction: d-SPE) (Anastassiades et al. 2003). Para ello una alícuota de 8.0 mL de la fase superior del producto de extracción de

ambos métodos se adicionaron a un tubo con 1,2 g de  $MgSO_4$ , 400 mg de PSA (Amina Primaria Secundaria, PSA SPE Bulk Sorbent Agilent) y 400 mg de  $C_{18}$  (Octadecilsilano, SampliQ  $C_{18}$  Agilent). La mezcla se agitó manualmente por 1 min y se centrifugó por 4 minutos a 1500 rpm. Se tomaron 5,0 mL de la capa superior y se filtró usando un filtro de Nylon de 20  $\mu m$ ; posteriormente, a 4,0 mL del sobrenadante se evaporó el extracto hasta 0,3 mL con un chorro de  $N_2$  a una temperatura de 45 °C. Se aforó hasta 1,0 mL con ACN y se adicionó una pequeña cantidad de  $MgSO_4$  como agente secante (hasta alcanzar un volumen de 1,3 mL), finalmente, la muestra se centrifugó por 1 minuto para su posterior análisis por GC-ECD.

### Condiciones y análisis por cromatografía de gases

Para el análisis por GC-ECD, se usó un volumen de inyección de 1,0  $\mu L$  con 3 lavados de pre y post-inyección, temperatura del inyector de 260 °C en modo splitless, gas portador helio con una presión de 100 kPa, una columna SIHM-35MS (15 m x 0,32 d.i x 0,32  $\mu m$  e.f). El programa de temperatura de horno fue el siguiente: 60 °C (1 min); 25 °C  $min^{-1}$  hasta 200 °C (0 min), 3 °C  $min^{-1}$  hasta 220 °C (7 min), 25 °C  $min^{-1}$  hasta 250 °C (1 min.). El detector de captura electrónica trabajó en una temperatura de 290 °C, con una corriente de 1 nA, utilizando como gas auxiliar argón con un flujo de 20 mL  $min^{-1}$ .

Para la identificación de coextractivos en los extractos analizados, se utilizó cromatografía de gases con acople a masas (GC-MS) en modo SCAN. Se utilizó un volumen de inyección de 1,0  $\mu L$  en modo splitless, gas portador helio a presión constante de 57.5 kPa, en una columna SHRXI 5MS (30 m x 0,25 d.i x 0,25  $\mu m$  e.f). La programación de temperatura de horno fue la siguiente: 60 °C (2min), 10 °C  $min^{-1}$  hasta 310 °C (13 min). El espectrómetro de masas trabajó en modo de ionización +EI 70 Ev, bajo una temperatura de fuente de iones de 290 °C y de 280 °C en la interfase. El sistema se trabajó en

modo full-scan entre 50-400 u.m.a.

Las condiciones de separación cromatográficas fueron establecidas utilizando mezclas de plaguicidas en solvente inyectadas repetidamente a medida que se variaban las condiciones instrumentales del cromatógrafo para obtener la mejor resolución entre picos y un menor tiempo de análisis.

### Preparación de soluciones de calibración

Se estudiaron nueve plaguicidas, cinco organofosforados (OPs), Diclorvos, Diazinón, Disulfotón, Dimetoato, Clorpirifos, y cuatro organoclorados (OCs),  $\alpha$ -BHC, Endosulfán I, Endosulfán II, Endrín y Dieldrín, todos adquiridos en ChemSrevice y Dr Ehrertorfer con purzas superiores al 98,3%. Se prepararon soluciones individuales de los estándares en ACN a una concentración de 1000 mg  $L^{-1}$ , a partir de las cuales se preparó una mezcla de los plaguicidas (22,5 mg  $L^{-1}$  de OCs y 90 mg  $L^{-1}$  de OPs). Se prepararon cinco niveles de calibración en solvente y en matriz (*matrix-matched calibration*), en un rango entre 22-52  $\mu g L^{-1}$  para OCs y entre 90-210  $\mu g L^{-1}$  para OPs. Las soluciones de calibración en matriz fueron preparadas utilizando determinadas cantidades de la mezcla madre de plaguicidas y aforando a 1,0 mL con extracto de maíz orgánico (limpio de plaguicidas) obtenido por cada método de extracción.

### Proceso de fortificación

La exactitud de los métodos extractivos se evaluó preparando triplicados de fortificaciones de muestras de maíz en tres niveles de concentración: 90, 150 y 210  $\mu g kg^{-1}$  para OPs y de 22, 36 y 40  $\mu g kg^{-1}$  para OCs. Se tuvo en cuenta un tiempo de interacción muestra-plaguicida de 24 horas.

### Determinación del porcentaje de coextractivos (%Co)

Para determinar cuánta cantidad de materiales ajenos a los analitos fueron extraídos, se llevó

a cabo la determinación del porcentaje de coextractivos por medio del método gravimétrico implementado por Lehotay y Anastassiades (Anastassiades et al. 2003; Lehotay et al. 2010). Para ello se tomaron 5,0 mL de extractos limpios de cada uno de los métodos, se determinó su densidad y se depositaron en tubos de vidrio previamente pesados (totalmente secos). Todos los tubos se llevaron a sequedad con un chorro de nitrógeno y posteriormente se calentaron en un horno a 110 °C por 1 hora.

### **Determinación del contenido de agua en los extractos**

La cantidad de agua en los extractos obtenidos por cada método se determinó mediante una metodología empírica que se basó en mediciones de densidad utilizando curvas de calibración en cuyas soluciones se varió la cantidad de agua (entre 0,5 – 11% del volumen). Inicialmente se preparó una mezcla de ACN y coextractivos con el objetivo de simular la matriz de extracción libre de agua. Los coextractivos se obtuvieron de manera similar que en el apartado anterior, se redisolviéron en ACN y se homogenizaron por 30 s mediante ultrasonido.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Proceso de extracción y limpieza**

Para el maíz blanco usado en este trabajo, el porcentaje de humedad fue de  $72,1 \pm 2,2\%$ , mientras que los contenidos de grasa y de proteína fueron  $2,2 \pm 0,3$  y  $4,9 \pm 0,8\%$ . La razón por la cual el proceso de humectación anterior al proceso de extracción se incluyó dentro de la metodología extractiva, se debe a que el método QuEChERS, es considerado desde sus inicios, como una metodología extractiva propia para frutas y vegetales con porcentajes de humedad altos (>80%) (Anastassiades et al. 2003; AOAC 2007; BS EN 15662:2008 2008; Lehotay et al. 2010); esta humedad es importante ya que permite una adecuada apertura de los poros de la muestra y al mismo tiempo facilita la

interacción con el solvente de extracción. Para muestras con un menor porcentaje de agua, se ha recomendado adicionar un paso de acondicionamiento que implica nivelar el contenido de agua en la muestra.

El maíz como la mayoría de alimentos es una matriz bastante compleja a la hora de realizar extracciones de plaguicidas, pues la gran cantidad de componentes dificultan el proceso extractivo. La eliminación de interferentes de matriz se vuelve especialmente problemática para métodos de extracción como el QuEChERS, que al ser un método multiclase multiresiduo trabaja en un amplio rango de propiedades fisicoquímicas que le permitan extraer el mayor número de plaguicidas, factor que lo hace al mismo tiempo más propenso a coextraer componentes no deseados de la matriz, como por ejemplo lípidos, carbohidratos, azúcares entre otros (coextractivos). Para eliminar las interferencias de los componentes propios de la matriz y en especial la eliminación de lípidos, se hizo necesaria la limpieza de los extractos con adsorbentes, en este caso con PSA y  $C_{18}$  (Lehotay et al. 2005; Mastovska et al. 2010).

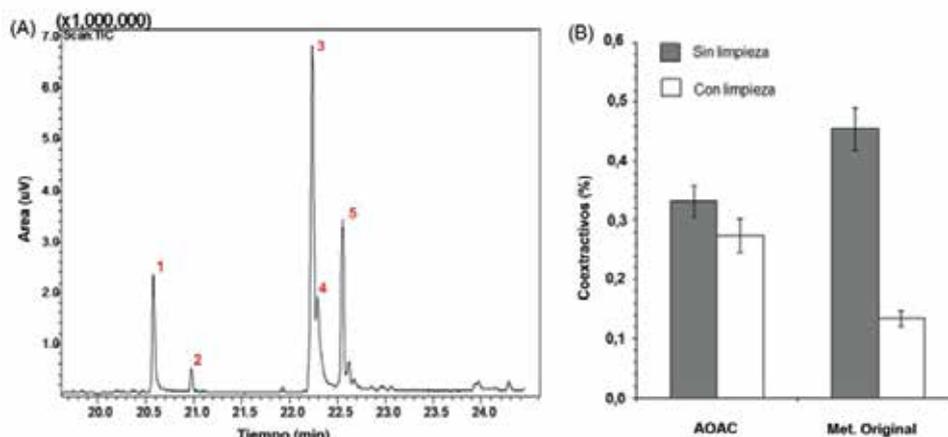
A pesar de su uso, las cantidades adicionadas no se logró eliminar en su totalidad éste tipo de componentes de matriz; en la figura 1A, se muestra un cromatograma en modo SCAN (GC-MS) de un extracto obtenido a partir de una de las variantes del método QuEChERS, en él se puede observar la presencia de lípidos que se coextraen durante el proceso, por ejemplo se detectó la presencia de ácidos grasos, entre ellos se identificaron el ácido pentadecanoico, ácido palmítico, ácido linoleico, oleico y esteárico. En este sentido, se ha reportado que la adición de una mayor cantidad de adsorbentes para mejorar la limpieza mediante la adición controlada de PSA genera extractos más limpios, sin comprometer los porcentajes de recuperación de compuestos lipofílicos (Mastovska et al. 2010).

Con el objetivo de comparar los dos métodos QuEChERS evaluados, inicialmente se recurrió a la determinación del porcentaje de coextractivos y el porcentaje de agua en los extractos finales. Aunque ambos métodos poseen el mismo principio de funcionamiento, las variaciones respectivas entre uno y otro pueden repercutir en la cantidad de componentes coextraídos. Anastasiades et al. (2003), mencionan que las variaciones de sales de partición no son tan importantes a la hora de determinar las diferencias entre métodos, sin embargo, el pH sí es un factor a tener en cuenta, ya que además de que algunos plaguicidas se pueden ver afectados en sus recuperaciones, la cantidad de coextractivos puede aumentar o disminuir en función de este parámetro fisicoquímico.

En la figura 1B se muestra los resultados obtenidos del porcentaje de coextractivos en cada método; para el método Original, el porcentaje de coextractivos en la etapa de extracción es mayor que el presentado por el método AOAC, resultado que pudo estar afectado por el uso del sulfato de magnesio monohidratado en el método original, posiblemente hubo una menor captación de agua por parte del monohidrato, provocando

una mayor polaridad en los extractos y favoreciendo la co-extracción de componentes lipídicos; en cuanto a los resultados después del proceso de limpieza, para el método AOAC los extractos limpios alcanzaron un porcentaje de coextractivos promedio de  $\approx 0,28\%$ , mientras que para el método original, sólo fue de  $\approx 0,14\%$ , mostrando entonces una mayor efectividad de limpieza para este último. Se presume que la menor efectividad de la limpieza del método AOAC es consecuencia de la utilización de ácido acético, ya que este compuesto pudo inhibir la acción del PSA lográndose una saturación e impidiendo que el adsorbente captara adecuadamente ácidos grasos y/o azúcares (Mastovska et al. 2010).

Durante la extracción, en la primera fase el porcentaje de humedad fue  $41,3 \pm 2,1$  para ambos métodos. En la segunda fase, los valores fueron  $9,49 \pm 0,9$  y  $8,54 \pm 0,8$  para el método AOAC y el método original, respectivamente. Los valores de pH en ese mismo orden fueron 4,0 y 6,0. Por otro lado, durante la limpieza por d-SPE, los contenidos de humedad fueron  $3,74 \pm 0,5\%$  (pH = 4,8) para el método AOAC y  $3,85 \pm 0,4\%$  (pH = 6,3) para el método original. Por consiguiente, en cuanto a la determinación del



**Figura 1.** (A) Cromatograma obtenido por GC-MS en modo SCAN de un extracto del método original: Ácido pentadecanoico (1), ácido palmítico (2), ácido linoleico (3), ácido oleico (4) y ácido esteárico (5). (B) Porcentaje de coextractivos para los métodos AOAC y Original (etapa de extracción y limpieza)

contenido de agua en los extractos finales no se encontraron diferencias notables entre uno u otro método y la relación acetonitrilo:agua en promedio fue de 92:8, siendo esto un resultado favorable debido a que elevadas cantidades de agua pueden perjudicar el sistema cromatográfico.

Los datos obtenidos en la determinación de agua sirven para observar algunas características generales del método en cuanto a la polaridad de los extractos en cada fase del proceso. En la etapa 1 de la extracción en donde hay sólo interacción muestra-ACN, la fase orgánica tuvo un contenido de agua promedio de 41,3%, porcentaje que si se compara con otros métodos multiresiduos como por ejemplo el método Mills (29-32% de agua) (Anastassiades et al. 2003), se observa que el método QuEChERS estaría por encima, este hecho influye negativamente en la extracción de compuestos polares. Sin embargo, la polaridad a lo largo del proceso se modifica con la segunda etapa, en donde ocurre simultáneamente la extracción y el particionamiento líquido - líquido por *salting-out*; la cantidad de agua calculada en esta etapa para ambos métodos es menor que en la primera, encontrándose una relación promedio de 92:8 (ACN:H<sub>2</sub>O), por tanto, en este punto, el acetonitrilo sería un solvente más efectivo en la extracción de los plaguicidas no polares, ocurriendo una retención más fuerte de los plaguicidas ya extraídos y una extracción simultánea de los plaguicidas que debido a efectos de polaridad no fueron extraídos en el primer paso.

En lo que respecta a la relación entre el pH y los porcentajes de coextractivos, algunos trabajos han evidenciado que la cantidad de coextractivos de ácidos grasos y de otros componentes aumenta a medida que el pH disminuye (Anastassiades et al. 2003); en éste caso se observó éste mismo comportamiento para los extractos después del proceso de limpieza ya que en la fase líquida se obtuvo

menor cantidad de coextractivos en el método original en donde el pH fue mayor que el pH obtenido para el método AOAC.

#### **Análisis por cromatografía de gases, GC-ECD**

Se evaluaron varios parámetros analíticos de calidad para verificar la exactitud y la precisión de los métodos extractivos usados. Los coeficientes de correlación lineal obtenidos ( $r^2$ ) fueron superiores a 0,9892 en el intervalo de 22-52  $\mu\text{g L}^{-1}$  para OCs y entre 90-210  $\mu\text{g L}^{-1}$  para OPs; las pruebas t de Student a un nivel de confianza del 95% permitieron corroborar un ajuste lineal en todos los casos. Los límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LQ) se calcularon como la concentración del analito más baja que da una relación señal-ruido (S/N) de 3 y 10 respectivamente, usando la desviación estándar de la regresión y las correspondientes pendientes de las curvas de calibración. La tabla 1 muestra que los valores de LD y LQ para el método no bufferado estuvieron en el rango de 0.23 – 4.75 y 0.70 – 14.4  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. Para el método AOAC 2001.01, los valores de LD y LQ estuvieron en el rango de 0,47 – 3,84 y 0,78 – 11,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Cabe resaltar que para el método AOAC, el Endosulfán II no pudo ser cuantificado por la presencia de un coextractivo lipídico que no permitió una aceptable cuantificación.

En la tabla 1 (última columna) se muestra el Límite Máximo de Residuos de cada plaguicida en maíz (LMR) (European Commission 2015), éstos límites han sido establecidos por la Unión Europea y son adoptados por muchas otras naciones para tener un lineamiento general de inocuidad. Como se puede observar, los LQ para ambos métodos de extracción permitirían cuantificar la presencia de alguno de éstos compuestos de acuerdo con los LMR establecidos, sólo para el Diclorvos se tendría dificultad en la cuantificación, sin embargo, es factible su detección.

**Tabla 1.** Coeficiente de determinación ( $r^2$ ), LQ  $\mu\text{g kg}^{-1}$  y LD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) para las curvas de calibración en matriz de los 10 plaguicidas de estudio.

| Plaguicida                   | Coeficiente de correlación lineal |             | LQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) |                 | LD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) |                 | <sup>(a)</sup> LMR ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) |
|------------------------------|-----------------------------------|-------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|--|
|                              | Met. No bufferado                 | Método AOAC | Método AOAC                  | Método original | Método AOAC                  | Método original |  |
| Diclorvos                    | 0,99                              | 0,99        | 11,62                        | 9,44            | 3,84                         | 2,62            | 10 (b)                                     |
| $\alpha$ -BHC(e)             | 0,99                              | 0,99        | 1,92                         | 1,94            | 0,63                         | 0,64            | 10   |
| Diazinón                     | 0,99                              | 0,99        | 9,49                         | 8,21            | 3,13                         | 2,71            | 20   |
| Disulfotón                   | 0,98                              | 0,99        | 6,58                         | 14,40           | 2,17                         | 4,75            | 20   |
| Dimetoato                    | 0,99                              | 0,99        | 9,27                         | 12,28           | 3,06                         | 4,05            | 20   |
| Clorpirifos                  | 0,99                              | 0,99        | 6,06                         | 10,88           | 2,00                         | 3,59            | 50   |
| Endosulfán I <sup>(c)</sup>  | 0,99                              | 0,99        | 1,41                         | 3,44            | 0,47                         | 1,14            | 50   |
| Dieldrín <sup>(d)</sup>      | 0,99                              | 0,99        | 2,44                         | 3,97            | 0,81                         | 1,31            | 10 (b)                                     |
| Endrín                       | 0,99                              | 0,99        | 1,53                         | 3,15            | 0,51                         | 1,04            | 10 (b)                                     |
| Endosulfán II <sup>(e)</sup> | 0,99                              | -           | -                            | 0,70            | -                            | 0,23            | 50   |

<sup>(a)</sup>Límite Máximo de Residuos (LMR) de cada plaguicida en maíz (European Commission 2015)

<sup>(b)</sup>Indica el límite inferior en la determinación analítica

<sup>(c)</sup>El valor de LMR corresponde a suma de isómeros alfa y beta y sulfato de Endosulfán, expresado como Endosulfán

<sup>(d)</sup>El valor de LMR corresponde a suma de Aldrín y Dieldrín calculada en forma de Dieldrín

<sup>(e)</sup>El valor de LMR corresponde a la suma de isómeros, excepto el isómero gamma

LD: Límite de Detección, LQ: Límite de Cuantificación

Los resultados de las fortificaciones realizadas para determinar los porcentajes de recuperación de los plaguicidas en cada método extractivo se muestran en la tabla 2 junto con los respectivos coeficientes de variación (CV). Las recuperaciones medias de los plaguicidas estudiados estuvieron entre 71,4% y el 111,6% para el método original, con desviaciones estándar menores al 9,2%; para el método AOAC 2007.01, las recuperaciones obtenidas estuvieron entre el 71,1% y el 119,3% con desviaciones estándar menores al 12,3% (con excepción del Endosulfán II). De manera general los porcentajes de recuperación y coeficientes de variación obtenidos son cercanos a los ya reportados en evaluaciones del método QuEChERS en diversas matrices como por ejemplo lechuga, naranja, arándanos, manzanas, limas, con recuperaciones entre 70

– 120% y CV inferiores al 10% (Lehotay et al. 2005; Lehotay et al. 2010). De igual manera, Mastovska et al. (2010) obtuvieron porcentajes de recuperación entre 70-120% con CV inferiores al 20% en cereales incluyendo maíz amarillo.

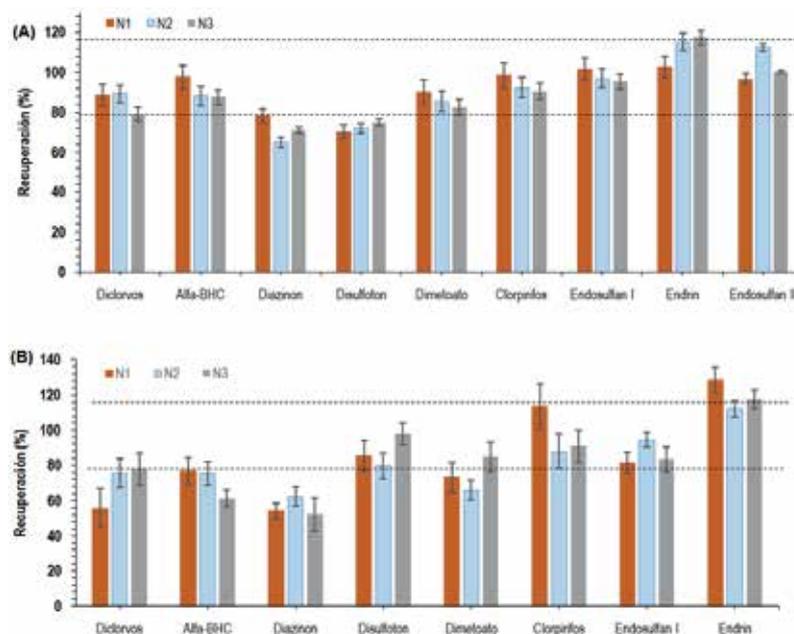
El promedio de las recuperaciones obtenidas en cada nivel de dopaje (N1, N2, N3) se muestra en la figura 2. En las gráficas se demarcan los valores límite superior e inferior aceptables para las recuperaciones en un método cuantitativo (70-120%) (SANCO 2013). El 100% de los plaguicidas analizados por el método no bufferado mostraron estar entre los límites aceptables, mientras que para el método AOAC, los resultados muestran ser dispersos, para el Diazinón por ejemplo se obtuvo un resultado inaceptable de alrededor del 56%.

**Tabla 2.** Recuperaciones promedio (%) (n = 9) y coeficientes de variación (%CV) obtenida de 10 plaguicidas adicionados a muestras de maíz en tres niveles.

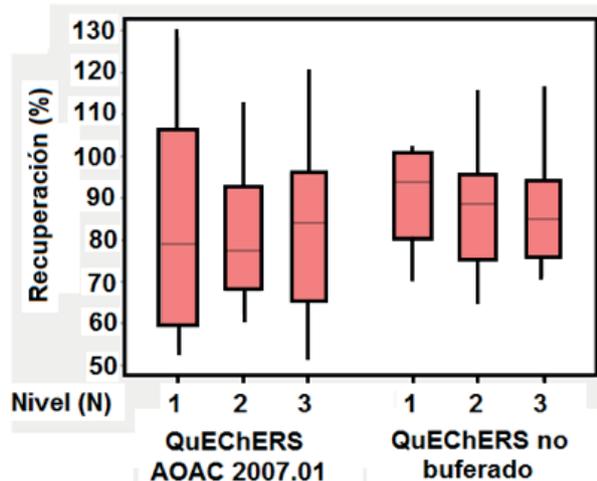
| Plaguicida    | Recuperación promedio (%) <sup>(a)</sup> |                 | CV (%) |          |
|---------------|--|-----------------|--------|----------|
|               | Método AOAC                              | Método original | AOAC   | Original |
| Diclorvos     | 69,60                                    | 85,53           | 17,64  | 6,62     |
| a-BHC         | 71,10                                    | 91,03           | 12,22  | 6,24     |
| Diazinon      | 56,07                                    | 71,38           | 9,78   | 9,21     |
| Disulfoton    | 87,60                                    | 72,33           | 10,69  | 3,48     |
| Dimetoato     | 74,48                                    | 85,99           | 12,92  | 4,58     |
| Clorpirifos   | 97,33                                    | 93,64           | 14,38  | 4,49     |
| Endosulfan I  | 86,37                                    | 97,89           | 8,16   | 3,30     |
| Endrin        | 119,30                                   | 111,60          | 6,97   | 7,15     |
| Endosulfan II | -  | 102,97          | -      | 8,04     |
| Dieldrín      | 91,40                                    | 90,87           | 9,48   | 4,20     |

(a)Calculado a partir de 9 valores (n = 9).  
Met. AOAC: Método AOAC 2007.01.  
Met. Original: Método Original 2003.

Con el objetivo de comparar los resultados entre métodos, se elaboró una gráfica de cajas del promedio de todos los porcentajes de recuperación obtenidos junto con los respectivos CV (Figura 3). La gráfica de cajas correspondiente a la recopilación de los porcentajes de recuperación de cada uno de los analitos, muestra que para el método no bufferado, las medianas obtenidas en los tres niveles de dopaje están por encima de las medianas obtenidas por el método AOAC, lo anterior sugiere que los resultados poseen una variabilidad menor. Para el método AOAC, las medianas correspondientes a los porcentajes de recuperación no están muy alejadas entre cada nivel de dopaje, sin embargo, se obtuvieron recuperaciones de una variabilidad considerable, teniendo en cuenta que, los coeficientes de variación obtenidos en cada nivel para éste método también resultaron ser dispersas en un rango entre 0,12 – 11,3%.



**Figura 2.** Porcentajes de recuperaciones obtenidos a tres niveles de calibración (N1, N2 y N3) para el Método QuEChERS no bufferado (A) y Método QuEChERS AOAC 2007.01 (B). Plaguicidas organoclorados: N1 (90 µg kg<sup>-1</sup>), N2 (150 µg kg<sup>-1</sup>), N3 (210 µg kg<sup>-1</sup>); plaguicidas organofosforados: N1 (22 µg kg<sup>-1</sup>), N2 (36 µg kg<sup>-1</sup>) y N3 (40 µg kg<sup>-1</sup>).



**Figura 3.** Diagrama de cajas para la comparación de medias obtenidas de los porcentajes de recuperación. Plaguicidas organoclorados: N1 (90 µg kg<sup>-1</sup>), N2 (150 µg kg<sup>-1</sup>), N3 (210 µg kg<sup>-1</sup>); Plaguicidas organofosforados: N1 (22 µg kg<sup>-1</sup>), N2 (36 µg kg<sup>-1</sup>) y N3 (40 µg kg<sup>-1</sup>).

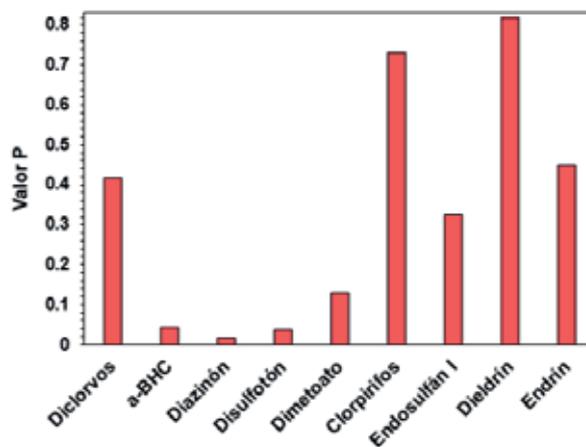
Adicionalmente, la comparación de ambos métodos mediante un contraste de significación (prueba t de Student de dos muestras,  $\alpha=0.05$ ) utilizando los promedios de recuperación para cada plaguicida y las respectivas desviaciones estándar; muestran que para el Diclorvos, a-BHC y el Diazinón se presenta una diferencia significativa en las recuperaciones entre ambos métodos ya que, como lo muestra la figura 4, los P-valores calculados se encuentran por debajo del nivel de significancia ( $\alpha$ ). Para éstos analitos, los porcentajes de recuperación resultan estar más cercanos al 100% en el método QuEChERS original y los CV obtenidos son más bajos que en el método AOAC 2007.01.

Los resultados anteriores muestran que en lo que respecta al proceso cromatográfico y de extracción, el método QuEChERS no bufferado presenta recuperaciones y desviaciones estándar relativas acorde con los requisitos de análisis de plaguicidas, a diferencia del método QuEChERS AOAC 2007.01, que no presentó

resultados consistentes, además de no poderse analizar uno de los plaguicidas en estudio.

Debido a que en el análisis de residuos de plaguicidas mediante cromatografía de gases la cuantificación de éstos comúnmente se ve afectada por un fenómeno conocido como “*matrix induced signal enhancement*” que resulta ser el incremento de la señal cromatográfica inducida por la matriz (Erney et al. 1993; Poole 2007), fue necesario calcular el porcentaje de efecto matriz (%EM) para cada método como parámetro adicional de calidad analítica. El análisis de efecto matriz consiste en la comparación de la respuesta obtenida con el analito en disolvente y la respuesta proporcionada por la misma cantidad de analito en presencia de matriz (Erney et al. 1993; Schenck y Lehotay 2000; Zrostlikova y Hajslova 2003; Lehotay y Anastassiades 2005; Poole 2007; Ahumada et al. 2010). En este caso, el análisis de efecto matriz se realizó comparando las áreas cromatográficas en solvente y en matriz expresada en forma de porcentaje (Ec. 1).

$$\text{Efecto Matriz (\%)} = \left( \frac{\text{Respuesta en matriz}}{\text{Respuesta en solvente}} \right) * 100 \quad \text{Ec.1}$$



**Figura 4.** P-valores obtenidos en el contraste de significación mediante pruebas t de Student: comparación de porcentajes de recuperación de los métodos QuEChERS evaluados.

Un efecto de la matriz de 100% indica las señales son las mismas y ningún cambio observable a la señal se produce en la muestra. Los valores de  $100 \pm 20\%$  se consideran adecuados e indican la ocurrencia de efectos de matriz pequeños. En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos de porcentaje de efecto de matriz para cada punto de calibración de ajuste matricial para ambos métodos.

Los resultados muestran que el 50% de los analitos presentan porcentajes de efecto matriz superiores al 100%, lo que indica que las respuestas cromatográficas en matriz son superiores a las registradas en solvente. Sólo para el Diclorvos, el  $\alpha$ -BHC, el Endosulfán I y II y el Dieldrin no se muestran diferencias superiores al 25%, mientras que los demás compuestos, en su mayoría organofosforados se presentan grandes diferencias entre las pendientes (alrededor del 90 y 200%). Estos resultados son bastante coherentes ya que

generalmente los compuestos organofosforados cuando se inyectan en solvente tienden a sufrir procesos de degradación y adsorción en el inyector, mientras que cuando son inyectados en presencia de componentes de matriz estos últimos actúan como agentes protectores que mediante diferentes mecanismos logran una mayor transferencia de los analitos hacia la columna obteniéndose áreas mayores que las obtenidas en solvente (Anastassiades et al. 2003; Lehotay y Anastassiades 2005; Poole 2007).

Según lo anterior, es evidente la influencia de la matriz en la respuesta cromatográfica de la mayoría de plaguicidas estudiados, encontrándose diferencias sustanciales entre las áreas en disolvente puro y en matriz; por lo tanto, es necesario utilizar la calibración con ajuste matricial para la cuantificación precisa, especialmente para plaguicidas organofosforados.

**Tabla 3.** Porcentaje de efectos de matriz promedio para los dos métodos QuEChERS (los elementos resaltados muestran los %EM >120).

| Plaguicida                     | PORCENTAJE DE EFECTO MATRIZ |       |       |       |       |                   |       |       |       |       |
|--------------------------------|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------------------|-------|-------|-------|-------|
|                                | QuEChERS AOAC 2007.01       |       |       |       |       | QuEChERS Original |       |       |       |       |
|                                | N1                          | N2    | N3    | N4    | N5    | N1                | N2    | N3    | N4    | N5    |
| <b>Diclorvos</b>               | 90,4                        | 101,9 | 95,5  | 95,6  | 100,4 | 87,7              | 90,4  | 101,9 | 95,5  | 95,6  |
| <b><math>\alpha</math>-BHC</b> | 99,0                        | 107,2 | 98,9  | 103,2 | 103,1 | 92,4              | 99,0  | 107,2 | 98,9  | 103,2 |
| <b>Diazinón</b>                | 135,6                       | 150,9 | 145,0 | 148,9 | 150,3 | 149,1             | 135,6 | 150,9 | 145,0 | 148,9 |
| <b>Disulfotón</b>              | 172,0                       | 187,8 | 173,7 | 173,2 | 174,3 | 123,6             | 172,0 | 187,8 | 173,7 | 173,2 |
| <b>Dimetoato</b>               | 205,2                       | 244,8 | 242,0 | 255,5 | 254,9 | 181,2             | 205,2 | 244,8 | 242,0 | 255,5 |
| <b>Clorpirifos</b>             | 131,7                       | 141,1 | 137,8 | 146,2 | 146,5 | 145,2             | 131,7 | 141,1 | 137,8 | 146,2 |
| <b>Endosulfán I</b>            | 90,5                        | 92,6  | 88,4  | 92,3  | 92,4  | 87,9              | 90,5  | 92,6  | 88,4  | 92,3  |
| <b>Dieldrin</b>                | 61,3                        | 63,5  | 61,4  | 64,6  | 63,4  | 93,4              | 61,3  | 63,5  | 61,4  | 64,6  |
| <b>Endrin</b>                  | 165,4                       | 182,4 | 188,8 | 205,7 | 211,5 | 133,6             | 165,4 | 182,4 | 188,8 | 205,7 |
| <b>Endosulfán II</b>           | -                           | -     | -     | -     | -     | 80,6              | -     | -     | -     | -     |

\*N1-N5: Niveles de calibración (rango entre 22-52  $\mu\text{g L}^{-1}$  para OCs y entre 90-210  $\mu\text{g L}^{-1}$  para OPs)

## CONCLUSIONES

Dos enfoques QuEChERS se evaluaron en la extracción de plaguicidas organoclorados y organofosforados en maíz blanco con posterior cuantificación por GC-ECD. El método QuEChERS no bufferado mostró parámetros de calidad analítica y metodológica consistentes y apropiados, obteniéndose recuperaciones entre 71,4% y el 111,6% para el método original, con desviaciones estándar menores al 9,2%, a diferencia del método QuEChERS AOAC 2007.01, el cual presentó dispersión en los resultados posiblemente por la presencia de coextractivos lipídicos que interfirieron en la cuantificación. Finalmente, los resultados presentados en este estudio demuestran que el método QuEChERS no bufferado es confiable para ser aplicado en el análisis cuantitativo de residuos de plaguicidas organoclorados y organofosforados en muestras de maíz.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Pontificia Universidad Javeriana (Sede Cali) y a la Fiscalía General de la Nación (Sede Cali) por el apoyo logístico en la realización de algunos de los análisis requeridos. De igual manera se agradece al Dr. Manuel Palencia por su oportuna colaboración.

## REFERENCIAS

- Ahumada, D. y Guerrero, J. 2010.** Estudio del efecto matriz en el análisis de plaguicidas por cromatografía de gases. *Vitae* 17(1): 51-58.
- Anastassiades, M., Lehotay, S., Stajnbaher, D. y Schenck, F. 2003.** Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* 86(2): 412-431.
- AOAC 2007.** AOAC Official Method 2007.01. Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate. [http://www.weber.hu/PDFs/QuEChERS/AOAC\\_2007\\_01.pdf](http://www.weber.hu/PDFs/QuEChERS/AOAC_2007_01.pdf) [5 Mayo 2015].
- BS EN 15662:2008 2008.** Foods of plant origin-determination of pesticide residues using GC-MS and / or LC-MS / MS following acetonitrile extraction / partitioning and clean- up by dispersive SPE-QuEChERS method. [http://www.chromnet.net/Taiwan /QuEChERS\\_ Dispersive\\_SPE/QuEChERS\\_%E6%A D % 9 0 % E 7 % 9 B % 9 F % E 6 % 9 6 % B 9 % E 6 % B 3 % 9 5 \\_ EN156622008\\_E.pdf](http://www.chromnet.net/Taiwan/QuEChERS_Dispersive_SPE/QuEChERS_%E6%A D % 9 0 % E 7 % 9 B % 9 F % E 6 % 9 6 % B 9 % E 6 % B 3 % 9 5 _ EN156622008_E.pdf) [5 Mayo 2015].
- Chen, G., Pengying, C. y Renjiang, L. 2011.** A multi-residue method for fast determination of pesticides in tea by ultra performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry combined with modified QuEChERS sample preparation procedure. *Food Chemistry* 125(4):1406-1411.
- Cieřlik, E., Sandowska-Rocięk, A., Molina, J. y Surma-Zadora, M. 2011.** Evaluation of QuEChERS Method for the Determination of Organochlorine Pesticide Residues in Selected Groups of Fruits. *Food Chemistry* 125(2):773-778.
- Erney, D., Gillespie, A., Gilvydis, D. y Poole, C. 1993.** Explanation of the Matrix-Induced Chromatographic Response Enhancement of Organophosphorus Pesticides during Open Tubular Column Gas Chromatography with Splitless or Hot on-Column Injection and Flame Photometric Detection. *Journal of Chromatography A* 638 (1):57-63.
- European Commission 2015.** EU-Pesticides Database-Pesticides EU-MRLs Regulation (EC) No 396/2005. <http://ec.europa.eu/>

dgs/health\_food-safety/index\_en.htm [18 Octubre 2015].

**FAO 2001.** Depósito de documentos. El Maíz En Los Trópicos: Mejoramiento y Producción. <http://www.fao.org/docrep/003/x7650s/x7650s00.htm#toc> [1 Octubre 2015].

**ICONTEC 2003.** Norma técnica colombiana NTC 2227: granos y cereales, maíz, determinación del contenido de humedad (en granos enteros y en granos molidos). <http://icontec.org/index.php/es/e-normas> [9 Octubre 2015].

**Koesukwiat, U., Lehotay, S., Miao, S., y Leepipatpiboon, N. 2010.** High Throughput analysis of 150 pesticides in fruits and vegetables using QuEChERS and low-pressure gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217(43):6692-6703.

**Lehotay, S. y Anastassiades, M. 2005.** Combination of Analyte Protectants To Overcome Matrix Effects in Routine GC Analysis of Pesticide. *Analytical Chemistry* 77 (24): 8129–8137.

**Lehotay, S., Maštovská, K. y Yun, S. 2005.** Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticide Residue Analysis in Fatty Food Matrixes. *Journal of AOAC International* 88(2): 630-638.

**Lehotay, S., Son, K., Kwon, H., Koesukwiat, U., Fu, W., Mastovska, K., Hoh, E. y Leepipatpiboon, N. 2010.** Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A* 1217(16): 2548-2560.

**Mastovska, K., Dorweiler, K., Lehotay, S., Wegscheid, J y Szpylka, K. 2010.** Pesticide multiresidue analysis in cereal grains using modified QuEChERS method

combined with automated direct sample introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(10): 5959-5972.

**Nuss, E. y Tanumihardjo, S. 2010.** Maize: A Paramount Staple Crop in the Context of Global Nutrition. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9(4): 417-436.

**Poole, C. 2007.** Matrix-Induced Response Enhancement in Pesticide Residue Analysis by Gas Chromatography. *Journal of Chromatography. A* 1158(1-2): 241-250.

**SANCO 2013.** SANCO/12571/2013-Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. [http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl\\_article.asp?CntID=727](http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=727) [8 Octubre 2015].

**Schenck, F. y Lehotay, S. 2000.** Does Further Clean-up Reduce the Matrix Enhancement Effect in Gas Chromatographic Analysis of Pesticide Residues in Food? *Journal of Chromatography A* 868(1): 51-61.

**Turiel, E. y Martín-Esteban, A. 2008.** Sample handling of pesticides in food and environmental samples. En: Tadeo, J. (Ed). *Analysis of pesticides in food and Environmental samples*. CRC Press, New York, p35-56.

**USDA/FAS 2014.** United states department of agriculture and foreign agricultural service. corn 2014: production, supply, demand database. <http://www.pecad.fas.usda.gov/cropexplorer> [5 Octubre 2015].

**Zrostlíkova, J. y Hajslova, J. 2003.** Matrix Effects in ( Ultra ) Trace Analysis of Pesticide Residues in Food and Biotic Matrices. *Journal of Chromatography* 1000(1-2):181-197.