

Procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva QuEChERS para el análisis de plaguicidas

Apellidos, nombre	Fuentes López, Ana (anfuelo@upv.es) García Martínez, Eva (evgamar@tal.upv.es) Fernández Segovia, Isabel (isferse1@tal.upv.es)
Departamento	Tecnología de Alimentos
Centro	Universitat Politècnica de València



1 Resumen de las ideas clave

La determinación de residuos de plaguicidas es un proceso analítico complejo que implica un conjunto de etapas que van desde la toma de muestra hasta la interpretación de los resultados obtenidos. Una de las fases más importantes en este proceso es la extracción de los analitos de la muestra para que estos puedan ser analizados correctamente. En el análisis multiresiduo de plaguicidas en frutas y vegetales, uno de los métodos de extracción más utilizados es la extracción en fase sólida dispersiva-“QuEChERS” por ser uno de los procedimientos más rápidos y sencillos. Este método combina dos etapas, una etapa de extracción de la muestra con acetonitrilo y diferentes sales, y una fase de dispersión en fase sólida donde se realiza una limpieza o “clean-up”. A continuación, tras la extracción y concentración de los analitos, puede realizarse la identificación y cuantificación de los compuestos de interés por análisis cromatográfico.

2 Introducción

Según el Codex Alimentarius¹ se considera plaguicida “cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción y/o almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos”.

A pesar de los beneficios que supone el uso de plaguicidas para asegurar la producción primaria (vegetal y animal), el uso de estos compuestos implica también ciertos riesgos para la salud y del medio ambiente. Debido a que la seguridad de los consumidores y del medio ambiente prima sobre los intereses de la producción agrícola y ganadera, las autoridades sanitarias tienen la responsabilidad de autorizar, registrar y limitar el uso de estos compuestos. En este sentido, para garantizar que el consumo de los alimentos no suponga un riesgo para la salud, la legislación establece un Límite Máximo de Residuo (LMR) de los productos fitosanitarios.

La preocupación de la sociedad por la calidad toxicológica de los alimentos y más concretamente por los niveles de residuos de compuestos tóxicos en los mismos, ha provocado que las legislaciones alimentarias a nivel mundial sean cada vez más exigentes en cuanto al límite máximo de residuos (LMR) y al número de sustancias a controlar. Estas exigencias hacen necesario el desarrollo de metodologías analíticas cada vez más sensibles y selectivas, que permitan la detección y cuantificación de compuestos de características y naturaleza muy diferentes y a las concentraciones tan bajas que permite la legislación.

Para garantizar unos resultados analíticos fiables y precisos, las etapas de preparación de la muestra y extracción son decisivas. Entre los procedimientos de extracción más empleados en la actualidad se encuentra la extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) por ser uno de los métodos más rápidos y sencillos. Basado en este tipo de extracción, Anastasiades y col.² desarrollaron una nueva metodología para el análisis de residuos de plaguicidas en material vegetal denominada “QuEChERS”, acrónimo en inglés de **Q**uick (rápido), **E**asy (fácil), **C**heap (barato), **E**ffective (efectivo), **R**ugged (robusto), **S**afe (seguro). La



metodología "QuEChERS" permite una extracción simplificada de un gran número de residuos de pesticidas multiclase y multiresiduo en un amplio rango de matrices con características muy diferentes. Este procedimiento, aunque fue desarrollado inicialmente por el departamento de agricultura de Estados Unidos (FDA) para la determinación de plaguicidas en vegetales, ha sido también aceptado por la AOAC³ (AOAC 2007.01) y en Europa adaptado mediante la Norma EN 15662⁴.

El método "QuEChERS" combina una primera fase de extracción simple con acetonitrilo y diferentes sales y una segunda etapa de dispersión en fase sólida (dSPE). Esta última fase permite la eliminación del agua presente en la muestra y una limpieza o "clean-up", que se consigue adicionando una mezcla de sulfato de magnesio y un sorbente, que puede ser una amina primaria y secundaria (PSA), C₁₈, carbón negro grafitado (GCB), o la mezcla de estos, en función de las características de la muestra analizada.

Después de la etapa de extracción, el extracto obtenido puede analizarse por cromatografía de gases o cromatografía líquida. Las técnicas cromatográficas son probablemente las técnicas más empleadas para llevar a cabo estas determinaciones debido su elevada sensibilidad, su capacidad de separar, identificar y analizar de manera cualitativa y cuantitativa compuestos de naturaleza muy diferente, así como por la rapidez de los nuevos sistemas cromatográficos, que permiten obtener resultados analíticos en cada vez menos tiempo.

3 Objetivos

Mediante el presente artículo se pretende que el alumno sea capaz de:

- Seleccionar el protocolo de extracción "QuEChERS" más adecuado en función de los plaguicidas que se deseen determinar.
- Elegir la fase sólida dispersiva según el tipo de alimento analizado.
- Llevar a cabo el procedimiento experimental de extracción "QuEChERS".

4 Desarrollo

A continuación vamos a describir el fundamento del método "QuEChERS" y se detallará con un ejemplo práctico el protocolo de extracción aplicado al análisis de plaguicidas en muestras de naranja.

4.1 Fundamento

El método QuEChERS es un sistema de extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) que implica dos etapas fundamentales, una primera etapa de extracción simple seguida de una fase de limpieza del extracto mediante extracción en fase sólida por dispersión.

En la **primera etapa**, se realiza una extracción con un disolvente orgánico, generalmente acetonitrilo, en presencia de diferentes sales. Las sales que pueden ser empleadas en esta etapa son el sulfato de magnesio, el cloruro sódico, el citrato tribásico de sodio dihidrato y citrato de sodio dibásico sesquihidrato. La función de cada una de estas sales en la etapa de extracción es diferente:



- **Sulfato de magnesio** ($MgSO_4$) mejora la recuperación del analito al facilitar la partición de los pesticidas en la fase orgánica (acetonitrilo) gracias a que retiene agua.
- **Cloruro sódico** ($NaCl$) ayuda a controlar la polaridad favoreciendo la separación de fases entre el contenido de agua y la orgánica.
- **Acetato de sodio** ayudan a la regulación del pH.
- **Sales de citrato** se emplean para ajustar del pH a valores de 5,5 donde se extraen la mayoría de los componentes ácidos y básicos de la muestra.

La selección de las sales a emplear va a depender de los compuestos que se desean analizar y el tipo de protocolo de análisis a utilizar:

- **Método original "QuEChERS"**: utiliza sulfato de magnesio y cloruro sódico
- **Método AOAC** (AOAC 2007.01): emplea sulfato de magnesio y acetato de sodio
- **Método EN 15662**: combina sulfato de magnesio, cloruro sódico, citrato tribásico de sodio dihidrato y citrato de sodio dibásico sesquihidrato.

El método original "QuEChERS" (no tamponado) es el más simple y funciona adecuadamente con la mayoría de plaguicidas y matrices; sin embargo, es importante elegir los métodos tamponados (AOAC 2007.01 y EN 15662) cuando se analizan compuestos que son afectados por el pH del medio. Los métodos tamponados facilitan el control del pH durante la fase de extracción y optimizan la recuperación de los plaguicidas sensibles a los valores de pH.

La **segunda etapa** de este procedimiento corresponde a una limpieza o "clean-up" del extracto mediante la extracción en fase sólida dispersiva. Este paso facilita la eliminación del agua residual y de los compuestos presentes en la matriz del alimento que podrían provocar interferencias en el análisis, como los lípidos, azúcares, ácidos orgánicos y pigmentos. Las sales y sorbentes empleados en esta fase son:

- **Sulfato de magnesio** ($MgSO_4$): elimina el exceso de agua residual.
- **Amina primaria/secundaria** (PSA): elimina ácidos orgánicos, ácidos grasos, azúcares y pigmentos de antocianina.
- **Sorbente C₁₈**: elimina grasas, esteroides y otras interferencias no polares de la muestra.
- **Carbón negro grafitado** (GCB): elimina pigmentos de la muestra como clorofilas y carotenoides, sin afectar a los compuestos planares.

La selección de la fase sólida dispersiva va a depender del tipo de alimento que es analizado, así existen diferentes protocolos de "clean-up" para:

- Frutas y verduras en general.
- Frutas y verduras con grasas y ceras.
- Frutas y verduras pigmentadas (vegetales verdes, zanahorias, vino,...)
- Frutas y verduras altamente pigmentadas.
- Frutas y verduras con pigmentos y grasas (estos también pueden emplearse para el análisis de leche, carne y pescado).

Después del proceso de limpieza, se lleva a cabo una centrifugación y el extracto está listo para ser directamente analizado o sometido a evaporación y recomposición en el disolvente apropiado para su análisis.



Aunque el método "QuEChERS" fue desarrollado inicialmente para el análisis de plaguicidas en alimentos vegetales, en la actualidad, se emplean algunas modificaciones de este método, con el objetivo de adaptarse a las distintas matrices y a nuevos compuestos. En este sentido, hay métodos adaptados para el análisis de pesticidas en aceites y alimentos infantiles, fármacos veterinarios en tejidos vegetales, fármacos en sangre, acrilamida,...

4.2 Ejemplo práctico

A continuación, vamos a ver con un ejemplo cual es el procedimiento experimental para la extracción en fase sólida dispersiva-"QuEChERS" de los residuos de plaguicidas presentes en una muestra de naranja.

El protocolo seleccionado para el análisis es el considerado en la Norma EN 15662. Por ello, las sales a emplear en esta etapa son el sulfato de magnesio, el cloruro sódico y las sales de citrato.

En la fase de extracción en fase sólida dispersiva (PSEd), emplearemos el procedimiento general para frutas y vegetales, ya que no se trata de muestras con un alto contenido lipídico ni fuertemente pigmentadas

4.2.1 Material y reactivos

Material e instrumentación:

- Balanza analítica
- Espátulas
- Pipeta automática (1-10 mL)
- Tubos de centrifuga

Reactivos químicos:

- Acetonitrilo (ACN)
- Sulfato de magnesio ($MgSO_4$)
- PSA (Amina Primaria/Secundaria)
- Cloruro sódico (NaCl)
- Citrato sódico tribásico ($Na_3C_6H_5O_4$)
- Citrato sódico dibásico sexquihidrato ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 6H_2O$)

4.2.2 Procedimiento experimental

1. Fase de extracción

- En un tubo de centrifuga se pesan 10 g de naranja previamente triturada, asegurando que el contenido sea homogéneo y lo más representativo posible de la fracción comestible de la muestra.
- Se añaden 10 mL de acetonitrilo y se agita vigorosamente durante 1 min.
- A continuación, se añaden 4 g $MgSO_4$, 1 g de NaCl, 1 g de citrato sódico tribásico y 0,5 g de citrato sódico dibásico sexquihidrato. Es importante

introducir en el tubo en primer lugar la muestra y luego las sales para evitar la aglomeración de estas.



Figura 1. Mezcla de la naranja, acetonitrilo y la sales de extracción

- Se agita manualmente de nuevo y se centrifuga durante 3 min a 3300 rpm.

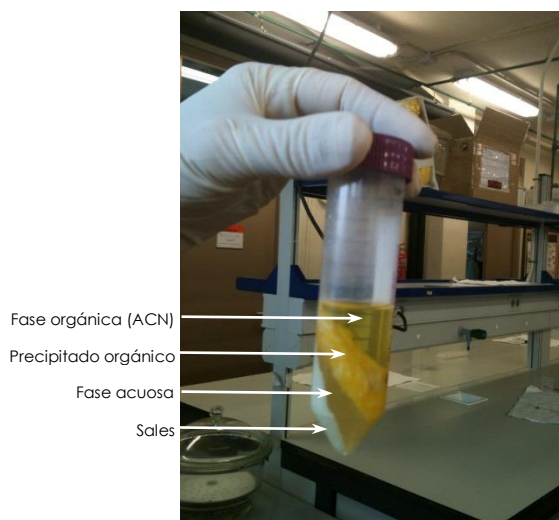


Figura 2. Separación de las fases tras la centrifugación de las muestras en la primera etapa de extracción

2. Fase SPE dispersiva

- Se toman 4 mL del sobrenadante obtenido tras la centrifugación y se llevan un tubo que contiene la fase dispersiva compuesta por 100 mg PSA y 600 mg $MgSO_4$.
- Se agita durante 30 s asegurando que se homogenizan todos los componente y se centrifuga de nuevo durante 3 min a 3300 rpm.

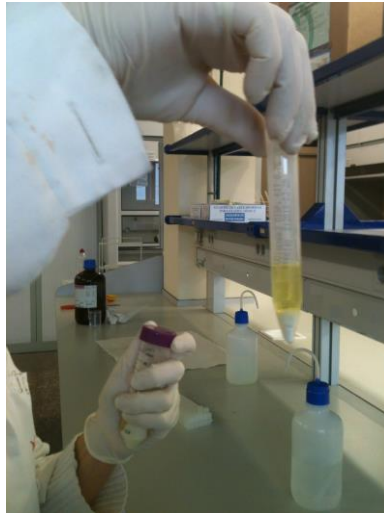


Figura 3. Separación de las fases tras la centrifugación de las muestras en la fase de extracción en fase sólida dispersiva

3. Concentración y cambio de disolvente

- Tras la centrifugación, se toma una alícuota de 1 mL del sobrenadante en un vial y se evapora a sequedad empleando corriente de nitrógeno.
- Finalmente, el residuo obtenido se disuelve en el disolvente más adecuado en función de la técnica cromatográfica a utilizar.

A continuación, puedes ver en un esquema las diferentes etapas del procedimiento de extracción "QuEChERS".

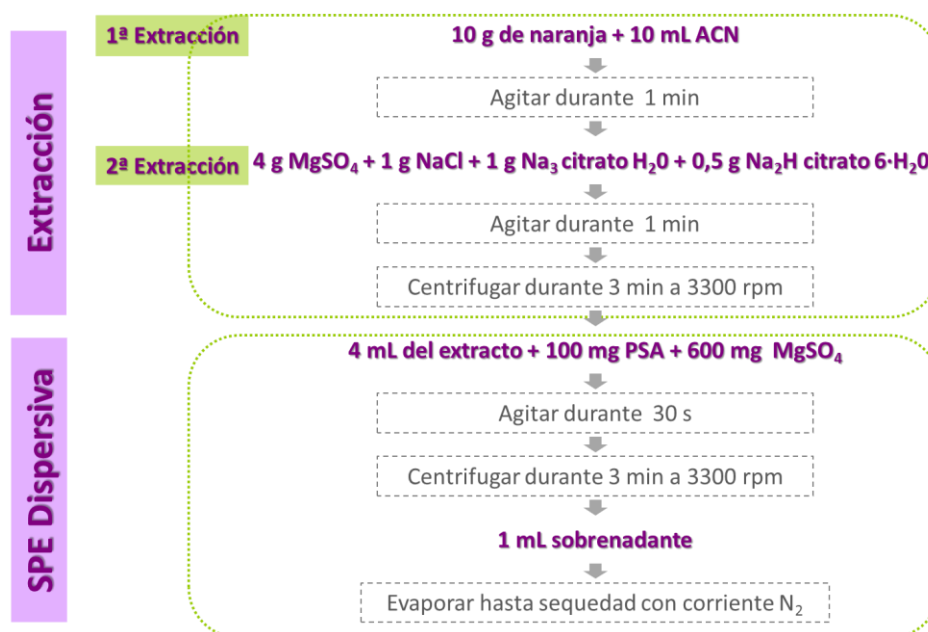


Figura 4. Esquema del procedimiento experimental empleado en la extracción en fase sólida dispersiva "QuEChERS"



5 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos descrito el procedimiento de extracción de residuos de plaguicidas presentes en un alimento empleando el método "QuEChERS". Además, se ha visto un ejemplo de esta técnica aplicada al análisis de plaguicidas en una muestra de naranja. El método de extracción en fase sólida dispersiva tipo "QuEChERS" es uno de los procedimientos de preparación de muestra más empleados en el análisis multiresiduos de plaguicidas por ser uno de los procedimientos más rápidos y sencillos.

6 Bibliografía

[1] FAO/OMAS (1997). "Comisión del Codex Alimentarius: Manual de procedimiento-Décima edición" Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. FAO. Roma (<http://www.fao.org>)

[2] Anastasiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., 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". Journal of AOAC International, 86(2):412-430.

[3] EUROPEAN STANDARDS CSN EN 15662. "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".

[4] AOAC Official Method 2007:01. "Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate".