

Determinación de residuos de siete insecticidas organofosforados en frutas mediante cromatografía de gases con detector de nitrógeno-fósforo y confirmación por espectrometría de masas

Calonge M, Pérez-Pertejo Y, Ordóñez C, Reguera RM, Balaña-Fouce R y Ordóñez D

Instituto de Toxicología de Castilla y León (INTOXCAL) y Unidad de Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad de León (ULE).
Campus de Vegazana s/n 24071 León (Spain)

Recibido 6 de Agosto de 2001 / Aceptado 19 de Febrero de 2002

Resumen: Se ha estudiado la presencia de residuos de siete insecticidas organofosforados en peras y manzanas adquiridas en la provincia de León. Se ha utilizado un sistema de extracción para matrices acuosas y determinación analítica mediante cromatografía de gases (GC) y detección con un detector de nitrógeno-fósforo (NPD). Las muestras positivas se confirmaron mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC/MS). Los insecticidas analizados mediante una técnica de extracción de multiresiduos fueron: diclorvos, diazinón, metilparatión, metilpirimifós, paratión, malatión y fentión. Se han analizado 54 muestras obtenidas en la cesta de la compra de la ciudad de León, 28 manzanas (13 de la variedad Reineta y 15 de la variedad Golden) y 26 peras (15 de la variedad Conferencia y 11 de la variedad Blanquilla), de las que aparecieron 6 (11 %) unidades (1 manzana de la variedad Reineta, 3 peras de la variedad Conferencia y 2 peras de la variedad Blanquilla) contaminadas con diazinón. Ninguna de las muestras sobrepasó el límite máximo de residuos (LMR) establecido para este compuesto (0.5 ppm) por el RD 280/94 en productos vegetales. Los datos de consumo medio por habitante de Castilla y León de peras y manzanas nos han permitido conocer la ingesta diaria estimada (IDE) del diazinón (rango 0,004 - 0,045 µg/kg/día), que al compararlo con la ingesta diaria admisible (IDA) (2 µg/kg/día), permite estimar un margen de seguridad comprendido entre 44 y 500.

Palabras clave: Insecticidas organofosforados, análisis de residuos, estimación del riesgo, frutas

Abstract: Residue analysis of seven organophosphorous insecticides in fruit by GC/NPD and confirmation by mass spectrometry. The presence of seven organophosphate residues has been studied in apples and pears acquired from the market in León (Spain). An extraction system for aqueous matrixes and a multiresidue analysis based on gas chromatography (GC) with nitrogen phosphorous detection (NPD) have been used. Positive samples were confirmed by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC/MS). The insecticides analyzed by a

multi-residue extraction technique were: dichlorvos, diazinon, methyl-parathion, methyl-pyrimiphos, parathion, malathion and fenthion. 54 samples were analysed from different sale points throughout the city of León; the fruit consisted of 28 apples and 26 pears. 6 (11 %) units (1 apple and 5 pears) were contaminated with diazinon. No other pesticide was found to be contaminating the fruit samples. Diazinon levels in the contaminated samples were below the maximum residue levels (MRL) established. Statistics of the average intake of apples and pears in Spain and the Castilla León community were used in order to determine the estimated daily intake (EDI) of diazinon (range 0.004 - 0.045 mg/kg/day) which, compared to the established admissible daily intake (2 µg/kg/día), leaves a safety margin ranging between 44 and 500.

Key words: Organophosphate insecticides, residue analysis, risk assessment, fruits

Introducción

La lucha contra plagas de insectos en árboles frutales, incluye el uso de métodos integrados, biológicos y químicos. A pesar de la toxicidad de estos últimos, la utilización de insecticidas de síntesis, sigue siendo el método más empleado para combatir las plagas, aunque se intentan utilizar sustancias de baja persistencia medioambiental [1].

Los insecticidas organofosforados tienen en la actualidad un papel preponderante como plaguicidas fitosanitarios a pesar de su problemática toxicológica. Su eficacia ha sido demostrada frente a pulgones (áfidos), como el pulgón lanígero del manzano (*Eriosoma lanigerum*), los insectos minadores, moscas de la fruta (*Ceratitis capitata*), ácaros, cochinillas, etc. La aplicación periódica en cebos envenenados en diferentes puntos del frutal, o bien el rociado total del árbol con compuestos de elevado poder de penetración, pueden provocar la aparición de residuos cuya importancia toxicológica debe ser evaluada regularmente.

Correspondencia: David Ordóñez Escudero. Facultad. de Veterinaria. Campus de Vegazana, s/n. 24071 León (Spain). Fax 987 291252. Tel. 987 291253. E-mail: dfrb@unileon.es

Abreviaturas utilizadas: Cromatografía de gases (GC), cromatografía de gases con detección de masas (GC/MS), m/z relación masa carga, NPD detector de nitrógeno-fósforo.

La monitorización de residuos de plaguicidas en alimentos, para la determinación del grado de exposición de una población humana, es crucial para determinar el grado de impregnación y las posibles consecuencias toxicológicas a largo plazo [2-6]. El control rutinario de residuos de plaguicidas debe realizarse tanto para aquellas moléculas de nueva síntesis que surgen como alternativas a los fitosanitarios menos eficaces o más contaminantes, como para estos últimos, aunque se haya determinado su restricción o prohibición [7-10].

Entre los métodos de análisis de multiresiduos utilizados para la determinación de insecticidas organofosforados, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) ha sido considerada un método de elección para la determinación rápida e inequívoca de residuos de estos plaguicidas [2, 12].

En el presente estudio se ha determinado la presencia de una serie de siete insecticidas organofosforados: diclorvós, diazinón, metil-paratión, metil-pirimifós, paratión, malatión y fentión en manzanas y peras de variedades de consumo anual, que se incluyen con regularidad en la cesta de la compra de la provincia de León. Como objetivo final se ha determinado la ingesta diaria estimada (IDE) de estos frutos con su correspondiente ingesta diaria admisible (IDA) con el fin de determinar el margen de seguridad de aquellos residuos que apareciesen contaminando los frutos estudiados.

Material y Métodos

Reactivos.— Los disolventes utilizados para la extracción de los insecticidas de las muestras de fruta fueron acetona, diclorometano y n-hexano (Merck, Darmstadt, Alemania) todos ellos de calidad para análisis de residuos. El agua ultrapura se preparó mediante ultrafiltración de agua destilada, utilizando un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Los estándares de diclorvós, diazinón, metil-paratión, metil-pirimifós, paratión, malatión y fentión fueron obtenidos como ingredientes activos (i.a.) (Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Alemania). Las disoluciones patrón se prepararon todas ellas en n-hexano a una concentración de 100 µg/mL.

Muestras analizadas.— El estudio se realizó sobre 54 muestras de fruta obtenidas aleatoriamente durante el mes de mayo de 1999, en mercados de la provincia de León, 28 manzanas y 26 peras, de dos variedades que se consumen durante todo el año: Reineta (13 unidades) y Golden (15 unidades) para las manzanas y Conferencia (15 unidades) y Blanquilla (11 unidades) para las peras.

Procedimiento de extracción.— Se ha seguido el método de extracción multiresiduos descrito por Leoni y cols. [11] para la cuantificación de insecticidas organofosforados en alimentos animales y vegetales. Fracciones de 20 g de pera o manzana, fueron trituradas en un molinillo y se mantuvieron en agitación con 25 mL de acetona (Merck) durante 20 min. La suspensión fue filtrada a través de un papel de filtro a un embudo de decantación de 250 mL lavando el residuo y el filtro con otros 10 mL de acetona. Se añadieron a un embudo de decantación 25 mL de una mezcla de acetona/agua (2:1), 25 mL de acetona, 25 mL de

diclorometano y 1,75 g de NaCl. La mezcla se extrajo vigorosamente durante 2 min y la fase orgánica se recoge en un embudo de vidrio con Na₂SO₄ anhidro, para eliminar cualquier resto de agua. La fase acuosa se volvió a lavar con 25 mL de diclorometano, recogiendo la fase orgánica que se juntó con la previamente extraída. La fase orgánica se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio a 40 °C y presión reducida. El extracto seco se resuspendió en 10 mL de n-hexano y se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se evaporó a sequedad con una corriente de N₂ a 40 °C y se almacenó a 4 °C antes de su análisis cromatográfico.

Equipos.— El análisis de las muestras se hizo mediante cromatografía de gases con detector de nitrógeno/fósforo (NPD), confirmando las muestras dudosas o positivas mediante cromatografía gaseosa acoplada a un detector de espectrometría de masas (GC/MS). Se utilizó un cromatógrafo de gases Fisons Instruments mod. 8560, con un detector de masas modelo MD800, equipado con un inyector automático de muestras.

Condiciones cromatográficas: Los plaguicidas fueron separados por GC en una columna DB17 de 50% fenil-metilpolisiloxano (J & W Scientific) de 30 m de longitud por 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de fase.

Para la determinación con detector de nitrógeno fósforo (NPD), se utilizaron las siguientes condiciones cromatográficas. Volumen de muestra 1 µL en splitless. El horno se programó como sigue: 70 °C (1 min) con una rampa de 20 °C/min, hasta 150 °C (1 min) y finalmente con una rampa de 3 °C/min, hasta 300 °C (10 min). Los gases y sus correspondientes presiones, utilizados como fase móvil fueron: Helio (100 kPa), nitrógeno (80 kPa), hidrógeno (50 kPa) y aire (100 kPa).

Para la determinación con detector de masas, las condiciones fueron diferentes. Volumen de muestra 1 µL en splitless. El horno se programó como sigue: 70 °C (2 min) con una rampa de 20 °C/min, hasta 220 °C (1 min) y finalmente con una rampa de 5 °C/min, hasta 310 °C (5 min).

Resultados y Discusión

Los insecticidas organofosforados estudiados constituyen tratamientos clásicos frente al agusanado de manzanas y peras (gen. *Carpocapsa*), así como contra el pulgón lanífero del manzano, aunque no son eficaces frente a insectos minadores, por lo que suelen combinarse con otros insecticidas, ya sean uréicos (teflubenzurón) o piretroides (cipermetrina, fenvalerato, etc.) [1].

Según Leoni y cols. [11], para la extracción de plaguicidas organofosforados de alimentos vegetales con bajo contenido en grasa y una proporción de agua superior al 45 %, el disolvente de elección debe ser la acetona ya que previene la formación de emulsiones que se pueden formar con pectinas de frutas y vegetales. Los porcentajes de recuperación utilizando este método (Tabla 1) son similares a los encontrados en otros estudios, si bien otros autores realizan dicho ensayo con concentraciones de organofosforados significativamente superiores (200 y 400 ppb) a las nuestras (50 ppb). La recuperación estimada osciló entre el 34 % (diclorvós) al 89 % (metil-paratión), siendo siempre superior en manzanas que en peras. La desviación estándar

Tabla 1. Reproducibilidad, límite de detección y porcentaje de recuperación de residuos de insecticidas organofosforados en frutas, utilizando la técnica de separación cromatográfica GC y detección con NPD.

Insecticida	Reproducibilidad			Límite de detección		Recuperación (%)#	
	teórico	experimental	C.V. (%)	manzana	pera	manzana	pera
diclorvós	1 ppm	0,99 ± 0,01	1,50	2 ng/g*	5 ng/g*	34	38
diazinón	1 ppm	1,01 ± 0,03	2,85	2 ng/g	2 ng/g	72	67
metil-paratión	1 ppm	1,01 ± 0,02	1,66	2 ng/g	2 ng/g	78	60
metil-pirimifós	1 ppm	0,99 ± 0,02	1,75	2 ng/g	2 ng/g	89	64
paratión	1 ppm	1,01 ± 0,02	1,90	2 ng/g	5 ng/g	72	70
malatión	1 ppm	1,00 ± 0,02	2,00	2 ng/g	5 ng/g	78	56
fentión	1 ppm	1,00 ± 0,02	2,35	2 ng/g	5 ng/g	70	53

(*) peso fresco. (#) n = 7

relativa osciló entre el 1 al 3 % (n = 7). Como se esperaba el menor porcentaje de recuperación correspondió al diclorvós que es el insecticida más polar y presenta por tanto mayor solubilidad en agua. La adición de NaCl al proceso de extracción líquido/líquido tiene como fundamento desplazar los insecticidas organofosforados más polares de la fase polar a la fase apolar al evitar la formación de emulsiones.

La Figura 1A muestra un cromatograma multiresiduo con patrones de cada uno de los plaguicidas utilizados en el estudio a la concentración de 1 µg/g (1 ppm), y detección con NPD. Los tiempos de retención calculados en las condiciones descritas en materiales y métodos fueron: diclorvós (9,14 min); diazinón (24,05 min); metil-paratión (29,66 min); metil-pirimifós (30,36 min); paratión (31,51 min); malatión (31,63 min); fentión

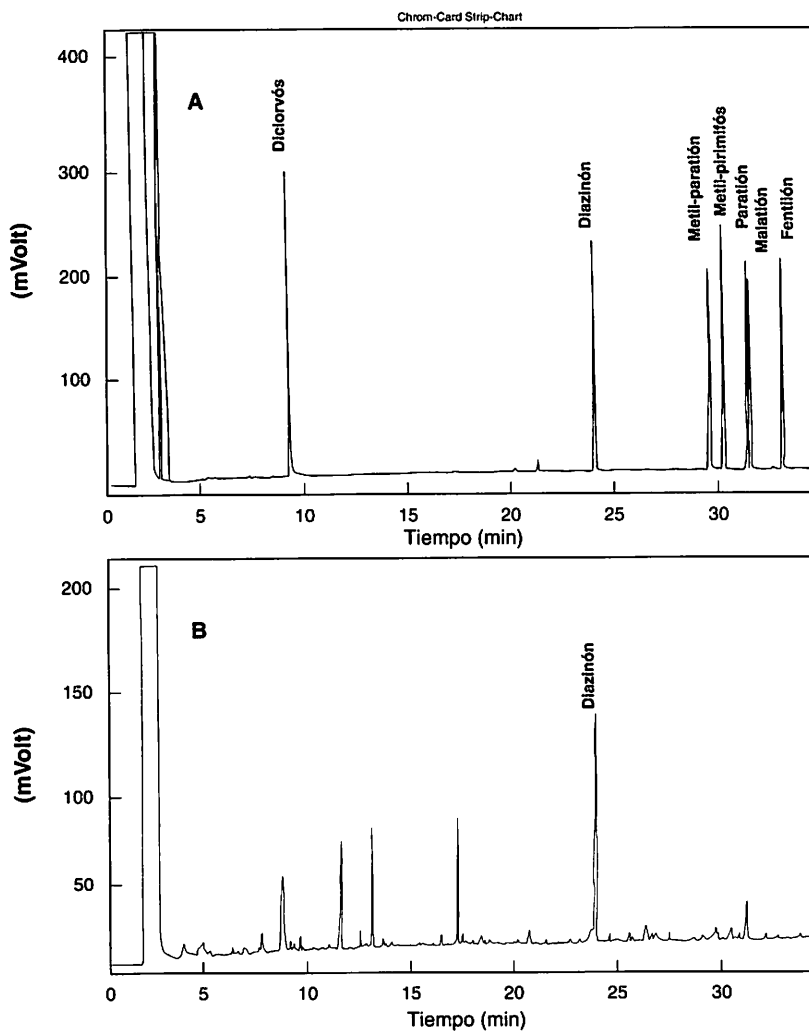


Fig. 1. Perfil cromatográfico de GC con detección de NPD, de un análisis multiresiduo de insecticidas organofosforados. El gráfico A, muestra un patrón de 1mg/mL de cada uno de los siete insecticidas. El gráfico B, muestra un fruto que presentó residuos de diazinón. Corresponde a una pera de la variedad Conferencia que presentaba un contenido de 42 ppb.

(33,19 min). Por su parte, la Figura 1B corresponde a una muestra de pera con un residuo de plaguicida organofosforado donde se observa claramente un pico a 24,1 min, identificable con diazinón por su tiempo de retención y en la biblioteca del detector. El resto de los picos del cromatograma no pudieron asignarse a ninguno de los ésteres fosfóricos analizados en el presente estudio.

La confirmación de la presencia de diazinón en las muestras positivas analizadas, se hizo mediante CG/MS en modo SIM (single ion monitoring), monitorizando los iones mayoritarios del compuesto a estudiar obtenido a partir de un estándar de diazinón. Las relaciones carga/masa (m/z) de dichos iones fueron: 304, 276, 248, 199 y 179. Los cromatogramas de la Figura 2 muestran que al tiempo de retención del patrón de diazinón se obtienen en la muestra máximos de los iones característicos que cumplen con las intensidades relativas del patrón. En ningún caso, los valores de diazinón encontrados en las muestras superaron el LMR establecido por la Legislación Española en 0,05 ppm [13] (Tabla 2).

El consumo nacional de peras y manzanas es de 43,10 g/persona/día y 23,60 g/persona/día, respectivamente, mientras que los

estimados para la Comunidad de Castilla y León son 45,40 g/persona/día y 30,50 g/persona/día, respectivamente. Estos datos proceden de la encuesta de presupuestos familiares realizada entre los años 1990-1991 por el Instituto Nacional de Estadística y tienen una validez de 10 años [14]. Por su parte, el peso medio de una persona, ha sido establecido en 60 kg de acuerdo a una estimación realizada por la FAO/OMS [15].

Los IDEs calculados para manzanas y frutas pueden variar ligeramente, ya que las determinaciones analíticas se han realizado en frutos sin pelar y, aunque los ésteres fosfóricos son muy penetrantes, cierta cantidad en la superficie de la fruta puede eliminarse en el pelado y lavado. La comparación entre los valores de IDE determinados para el diazinón y su correspondiente IDA obtenido de la bibliografía [16], supone un amplio margen de seguridad, estimado para el diazinón entre 44 y 500 veces la dosis diaria admisible (Tabla 3). A la vista de estos resultados podemos concluir que el riesgo toxicológico para la salud humana de insecticidas organofosforados por el consumo

Tabla 2. Residuos de plaguicidas organofosforados encontrados en peras y manzanas en la Comunidad de Castilla y León.

Tipo de fruta	Muestras contaminadas		Plaguicida		
	Total	Contaminadas (%)	Tipo	Concentración (min - máx.)	LMR*
manzana					
Reineta	13	1 (7,7)	diazinón	59 ppb	0,5 ppm
Golden	15	0 (0)	-	-	-
pera					
Conferencia	15	3 (20)	diazinón	12-48 ppb	0,5 ppm
Blanquilla	11	2 (18)	diazinón	9-42 ppb	0,5 ppm

* RD 280/1994 sobre residuos de plaguicidas (13)

Tabla 3. Determinación de una ingesta diaria estimada de diazinón, y comparación con su respectiva IDA en peras y manzanas consumidas en España y en la Comunidad de Castilla y León. El margen de seguridad se ha estimado considerando un consumo medio diario de cada fruta por persona [14] y un peso medio de 60 kg [15].

Tipo de fruta	Consumo de frutas (g/persona/día)	Estimación de riesgo		
		IDE (µg/kg/día)	IDA* (µg/kg/día)	margen de seguridad
manzana				
España	42,10	0,045	2	44
Castilla y León	45,40	-	2	-
pera				
España	23,60	0,006 - 0,024	2	83-333
Castilla y León	30,50	0,004 - 0,021	2	95-500

*Lu (1995) (16)

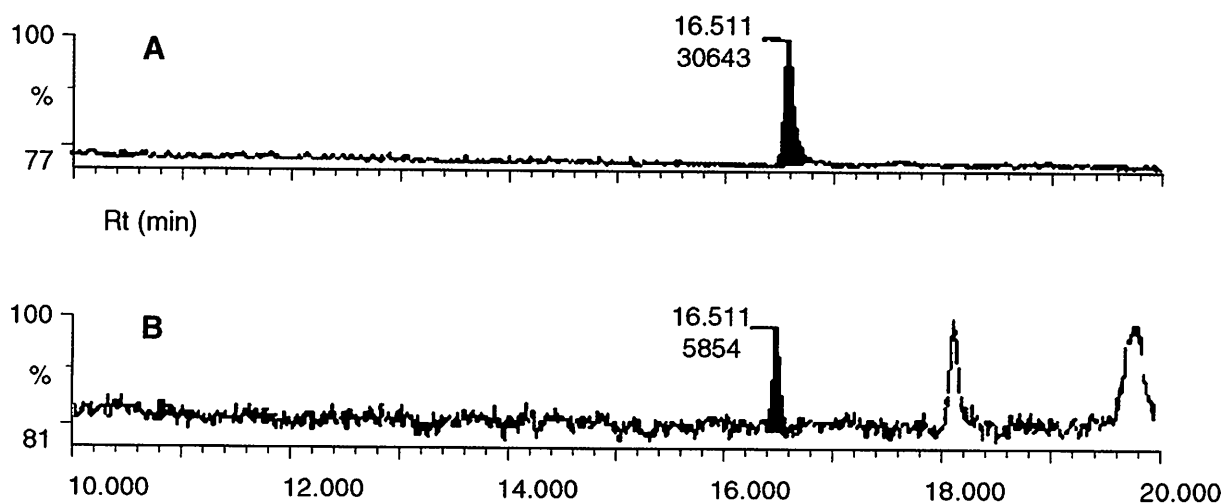


Figura 2. Perfil cromatográfico de GC con detección por espectrometría de masas (GC/MS), de un patrón de diazinón (A) y de una muestra de pera de la variedad Conferencia contaminada con 42 ppb de diazinón (B).

estándar de peras y manzanas es mínimo. Sin embargo, la presencia de residuos de uno de estos plaguicidas, recomendaría campañas de monitorización periódicas que asegurasen una incidencia mínima de estos productos, o de otros plaguicidas, en la salud humana.

Bibliografía

1. Barberá C. (1989) Pesticidas agrícolas. 4ª edición. Omega, Barcelona, pp. 124-170.
2. Dogheim SM, Gad Alla SA, el Syes SM, Almaz MM, Salama EY (1996) Organochlorine and organophosphorous pesticide residues in food from Egyptian local markets. *J. AOAC Int.* 79: 949-952.
3. Dogheim SM, Gad Alla SA, el Marsafy AM, Fahmy SM (1999) Monitoring pesticide residues in Egyptian fruits and vegetables in 1995. *J. AOAC Int.* 82: 948-955.
4. Torres CM, Picó Y, Marín R, Mañés J (1997) Evaluation of organophosphorous pesticide residues in citrus fruits from the Valencian community, Spain. *J. AOAC Int.* 80: 1122-1128.
5. Yen IC, Bekele Y, Kallou C (1999) Use patterns and residual levels of organophosphate pesticides on vegetables in Trinidad, West Indies. *J. AOAC Int.* 82: 948-955.
6. Cook J, Beckett MP, Reliford B, Hammock W, Engel M (1999) Mutiresidue analysis of pesticides in fresh fruits and vegetables using procedures developed by the Florida Department of Agriculture and Consumer Services. *J. AOAC Int.* 82: 1419-1435.
7. Navarro-García S, Cámara MA, Barba A, Toledano R, Luna A (1992) Incidence of residual levels of organophosphorous insecticides in farm produce in the Region of Murcia, Spain. Comparison of intake in the 1985-1986 and 1989 campaigns. *J. Appl. Toxicol.* 12: 251-254.
8. Fernández-García MA, Melgar-Riol MJ, Herrero-Latorre C, García-Fernández MI (1994) Evidence for safety for coumaphos, diazinon and malathion residues in honey. *Vet. Hum. Toxicol.* 36: 429-432.
9. Ahmad N, Bugueno G, Guo, Marolt R (1999) Determination of organochlorine and organophosphate pesticide residues in fruits, vegetables and sediments. *J. Environ. Sci. Health B* 34: 829-848.
10. Hamey PY, Harris CA (1999) The variation of pesticide residues in fruits and vegetables and the associated assessment of risk. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 30: S34-S41.
11. Leoni V, Caricchia AM, Chiavarini S (1992) Mutiresidue method for quantitation of organophosphorous pesticides in vegetable and animal foods. *J. AOAC Int.* 75: 511-518.
12. Pylypiw HM Jr. (1992) Rapid gas-chromatographic method for the mutiresidue screening of fruits and vegetables for organochlorine and organophosphate pesticides. *J. AOAC Int.* 76: 1369-1373.
13. Boletín Oficial del Estado 1994, Real Decreto 280/1994 por el que se establecen los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal. BOE núm 58 de 9-3-1994.
14. Instituto Nacional de Estadística (1991). Encuesta de presupuestos familiares, 1990-1991.
15. Codex Alimentarius Commission. Codex maximum residue limits for pesticides. <http://apps.fao.org/servlet/org.fai.waicent>. Codex. FAO 1990-1998.
16. Lu FC (1995) A review of the acceptable daily intakes of pesticides assessed by the World Health Organization. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 21: 351-364.