

Validación de un método analítico para la determinación de plaguicidas organofosforados en guayaba (*Psidium guajava* L.) empleando dispersión de matriz en fase sólida y cromatografía de gases con detección nitrógeno-fósforo

Validation of an analytical method to determine organophosphorus pesticides in guava (*Psidium guajava* L.) fruits by using matrix solid phase dispersion and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection

J. Raga-Carreño¹, G. Ettiene¹, R. Bauza² y D. Medina¹

¹Departamento de Química, Facultad de Agronomía. ²Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia, Maracaibo- Venezuela.

Resumen

Se validó un método de análisis para la determinación de dos plaguicidas organofosforados (POFs; clorpirifos y etil-paratión) en frutos de guayabo (*Psidium guajava* L.) basado en la técnica dispersión de matriz en fase sólida (DMFS). En el método propuesto, se empleó Florisil® como agente dispersante y una combinación de sulfato de sodio/Florisil®/carbón grafitado como fase de limpieza. La elución de los POFs se realizó con 10mL de una mezcla binaria de acetato de etilo/acetona (80:20% v/v). Los POFs se cuantificaron por cromatografía de gases usando un detector termoiónico nitrógeno-fósforo (GC-NPD). El método permitió altas recuperaciones de los plaguicidas analizados (97,29% y 93,31% para clorpirifos y etil-paratión, respectivamente), para dos niveles de adición (1 y 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Se obtuvo una alta precisión del método en términos de repetibilidad (DER < 7%) y reproducibilidad (DER < 11%), con límites de detección de 0,197 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y 0,172 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para clorpirifos y etil-paratión, respectivamente. El método es rápido, simple, sensible y reproducible, y puede ser usado en análisis rutinarios para determinar contaminación de frutos de guayaba por plaguicidas organofosforados

Palabras clave: Dispersión de matriz en fase sólida, extracción multiresidual, insecticidas organofosforados, guayaba, cromatografía de gases.

Abstract

An analytical method for the determination the organophosphorus pesticides (Ops; chlorpyrifos and ethyl-parathion) on guava (*Psidium guajava* L) fruits based on the matrix solid phase dispersion (MSPD) techniques, was validated. In this method, Florisil® was used as dispersant agent, and a combination of sodium sulphate/Florisil®/graphitized carbon black as clean-up phase. The pesticides elution was accomplished with 10mL of a binary mixture of ethyl acetate /acetone (80:20% v/v). Ops were quantified by gas chromatography using a nitrogen-phosphorous detector (GC-NPD). The method produced good recoveries of the OPs tested, chlorpyrifos (97.29% and 93.31% for chlorpyrifos and ethil-parathion, respectively) for two addition levels (1 and 10 µg.g⁻¹). The analytical method showed a high precision in terms of repeatability (RSD <7%) and reproducibility (RSD <11%) and detection limits of 0.197 µg.g⁻¹ and 0.172 µg.g⁻¹ for chlorpyrifos and ethyl-parathion, respectively. The method is rapid, simple, repeatability, and reproducible, and it can be used in routine analysis for measuring the organophosphorus pesticides contamination of guavas fruits

Key words: Matrix solid phase dispersion, multiresidual extraction, organophosphorus insecticides, guava, gas chromatography.

Introducción

La mayor producción nacional de guayabo está localizada en la región zuliana, específicamente en los municipios Mara y Baralt. Este cultivo presenta problemas entomológicos debido a infestaciones por *Capulinia sp* (Geraud *et al.*, 2001). Por tal motivo, las plantaciones son tratadas con insecticidas organofosforados, debido a su alta eficiencia, baja persistencia y toxicidad a largo plazo, al ser comparados con los insecticidas organoclorados; por tanto, si no existen buenas prácticas agrícolas, estos pueden estar presentes en los frutos en el momento de la cosecha, lo que implica un riesgo de contaminación química que podría impactar negativamente la salud del consumidor. La necesidad de garantizar la inocuidad de los frutos, ha permitido el desarrollo de metodologías

Introduction

The biggest nationwide guava production is located in Zulia, especially in Mara and Baralt parishes. This crop has entomological problems due to infestations produced by *Capulinia sp* (Geraud *et al.*, 2001). For this reason, plantations are treated with organophosphorous pesticides, due to their high efficiency, low persistence and toxicity at long term, when compared to the organ-chloride pesticides; therefore, if there are not good agriculture practices, these might be present in the fruits at the moment of the harvest, which implies a risk of chemical contamination that might impact negatively the consumer's health. The necessity of guaranteeing the safety of fruits has allowed the development of analytical methodologies for analyzing the

analíticas para análisis de residuos con una alta precisión y exactitud (Chai *et al.*, 2004; Díez *et al.*, 2006; Chavarri *et al.*, 2004).

Los métodos tradicionales empleados para la determinación de plaguicidas se llevan a cabo por procedimientos secuenciales, basados en extracción con solventes orgánicos mediante partición líquido-líquido seguido de la remoción de los concomitantes mediante varias etapas de limpieza (*clean-up*), aplicando extracción en fase sólida, reparto con disolventes orgánicos inmiscibles, cromatografía de adsorción y/o reparto en columna o cromatografía de permeación de gel (Picó y Font, 2003) y finalmente, etapas de concentración previo al análisis instrumental. Estas técnicas tradicionales de preparación de muestra exigen el empleo de grandes cantidades de las mismas (2-100 g), así como de sorbentes y solventes de alta pureza. Además, requieren etapas de re-extracción y evaporación del solvente (Ochiai *et al.*, 2005; Barker, 2000; Kristenson *et al.*, 2001; Kristenson *et al.*, 2006). Todo esto conlleva a un elevado manejo de los extractos y en consecuencia, se convierten en métodos costosos en términos de tiempo y consumo de reactivos, que los hace poco idóneos para el análisis de rutina (Torres *et al.*, 1996; Albero *et al.*, 2003).

Algunas de las dificultades asociadas con la extracción líquido-líquido y sólido-líquido de residuos de plaguicidas en productos agrícolas corresponden a la formación de emulsiones y el elevado consumo de reactivos, por tanto, para solventar estas dificultades Barker (1989) diseñó una técnica de tratamiento de

residuos accurately (Chai *et al.*, 2004; Díez *et al.*, 2006; Chavarri *et al.*, 2004).

The traditional methods employed for the determination of pesticides are carried out by sequential procedures, based on the extraction with organic solvents using liquid-liquid partition followed by the removal of concomitants in several clean-up phases (*clean-up*), applying extraction in solid phase, distribution in column or gel permeation chromatography (Picó and Font, 2003) and finally, concentration phases prior to the instrumental analysis. These traditional sample techniques require the employment of huge quantities of these (2-100 g), as well as high pureness sorbents and solvents. Also, require re-extraction and evaporation phases of the solvent (Ochiai *et al.*, 2005; Barker, 2000; Kristenson *et al.*, 2001; Kristenson *et al.*, 2006). All this implies an elevated handle of the extracts and therefore, become in more expensive methods in terms of time and consumption of reactive, which are not to suitable for analyzing the routine (Torres *et al.*, 1996; Albero *et al.*, 2003).

Some of the difficulties related to the extraction liquid-liquid and solid-liquid are residues of pesticides in agriculture products correspond to the formation of emulsions and the elevated consumption of reactive, therefore, to solve these problems Barker (1989) designed a sample treatment technique named matrix Solid Phase Dispersion (DMFS), which allows reaching solid, semi-solid and viscous samples, This type of proposal includes homogenization mechanisms,

muestra denominada Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) que permite analizar muestras sólidas, semi-sólidas y viscosas. Este tipo de propuesta incluye mecanismos de homogeneización, ruptura celular, extracción exhaustiva, fraccionamiento y limpieza en un solo proceso (Viana *et al.*, 1996; García de Llasera *et al.*, 2005; Capriotti *et al.*, 2010; Thurman and Mills, 1998). La DMFS se caracteriza por requerir una reducida cantidad de muestra (0,5-1,0g), sorbente y solvente (10-25mL); esto último refleja un bajo impacto ambiental.

En este trabajo se validó un método de análisis basado en la DMFS para la extracción de clorpirifos y etil-paratión en frutos de guayabo, seguido por la determinación instrumental empleando GC-NPD.

Materiales y métodos

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cromatografía adscrito al Instituto de Investigaciones Agronómicas de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia, Maracaibo.

Se emplearon estándares de los insecticidas clorpirifos y etil-paratión de grado analítico (98,5%; Dr. Ehernstorfer GMBH®, Alemania). Las soluciones madres de los insecticidas se prepararon a una concentración de 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en acetato de etilo (Merck®), a partir de las cuales se hicieron diluciones apropiadas para obtener las soluciones de calibración (acetato de etilo) y soluciones de adición estándar (metanol, Baker®); ambas se almacenaron en la oscuridad a una temperatura de 4°C hasta su uso.

cellular rupture, exhaustive extraction, fractioning and cleaning in one process (Viana *et al.*, 1996; García de Llasera *et al.*, 2005; Capriotti *et al.*, 2010; Thurman and Mills, 1998). DMFS is characterized by requiring a reduced quantity of the sample (0.5-1.0 g), sorbent and solvent (10-25 mL); the latter reflects a low environmental impact.

In this research was validated an analysis method based on DMFS for extracting chlorpyrifos and ethyl-parathion in guava fruits, followed by the instrumental determination employing GC-NPD.

Materials and methods

The research was developed in the Chromatography Laboratory of the Agronomy Research Institute of the Agronomy Faculty of Universidad del Zulia, Maracaibo.

Standards of chlorpyrifos and ethyl-parathion pesticides of analytical degree (98.5% Dr. Ehernstorfer GMBH®, Germany) were employed. The mother solutions of pesticides were prepared at a concentration of 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in ethyl acetate (Merck®), after which were done appropriate dilutions to obtain the calibration solutions (ethyl acetate) and standard addition solutions (methanol, Baker®); both stored in the dark at a temperature of 4°C until its usage. As internal standard was used triphenyl-phosphate (99%, Reidel of Haën®, Germany).

The solvents (analytical degree) employed for the elution of analytes in the development of this research were: acetone (99.8%, Reidel-of Haën®), ethyl

Como estándar interno se empleó trifenilfosfato (99%, Reidel de Haën®, Alemania).

Los solventes (grado analítico) empleados para elución de los analitos en el desarrollo de este trabajo fueron: acetona (99,8%, Reidel-de Haën®), acetato de etilo (98,05% E.M.Science®), *n*-hexano (98,05% E.M.Science®), y acetonitrilo (99,9 % Fischer Scientific Company®).

Las fases sólidas empleadas para DMFS fueron: Florisil (60-100 mesh, Reidel de Haën®), Sílice gel (Fischer Scientific Company®), Alúmina ácida (pH 4,5; 50-200 μm ; 200 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$, Reidel de Haën®) y celite (30-80 mesh, BDH Chemical LTD®). Los sorbentes se activaron por calentamiento durante 12h a 150°C antes de su uso, seguidamente, se enfriaron y almacenaron en un desecador (Blanco *et al.*, 2006; Morzycka, 2002). Se empleó sulfato de sodio anhidro (99% de pureza, Reidel-de Haën®) como agente desecante.

Las fases sólidas empleadas para la limpieza fueron: carbón activado (Fischer Scientific Company®), carbón grafitado (mesh 120/400, Alltech Associates, Inc®), C-18, octadecilsilano (%C=17%, tamaño de partícula 50 μm , tamaño de poro 60 μm , Grace®) su activación se realizó a través de lavados con metanol, aminopropil (%C= 5,0%, tamaño de partícula 50 μm , tamaño de poro 60 μm , Grace®), se activó con lavados con acetato de etilo (Zhao *et al.*, 1999).

Las muestras empleadas en la investigación fueron obtenidas al azar de los mercados locales de la ciudad.

Optimización

Un método analítico para la determinación de residuos de plaguicidas en matrices complejas como son los

acetate (98.05% E.M. Science®), *n*-hexane (98.05% E.M.Science®), and acetonitrile (99,9 % Fischer Scientific Company®).

The solid phases employed for DMFS were: Florisil (60-100 mesh, Reidel de Haën®), Silica in gel (Fischer Scientific Company®), Acid Alumina (pH 4.5; 50-200 μm ; 200 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$, Reidel of Haën®) and celite (30-80 mesh, BDH Chemical LTD®). Sorbents were activated by heating for 12h at 150°C before its usage, later, were let cold and stored in desiccators (Blanco *et al.*, 2006; Morzycka, 2002). Anhydrous sodium sulfate was used (99% of pureness, Reidel- of Haën®) as desiccant agent.

The solid phases employed for the cleaning-up were: active carbon Fischer Scientific Company®, graphite carbon (mesh 120/400, Alltech Associates, Inc®), C-18, octadecylsilane (%C=17%, size of the particle 50 μm , size of the pore 60 μm , Grace®), the activation was done through washings with methanol. Amino-propel aminopropil (%C= 5.0%, size of the particle 50 μm , size of the pore 60 μm , Grace®), it activated using ethyl acetate.

The samples employed in the research were obtained at random from the local markets in the town.

Optimization

An analytical method for determining the pesticide residues in complex matrixes such as the agriculture products, require the isolation of the matrix's analytes and clean-up of the extracts before the chromatographic determination. In this research, the two phases (extraction and cleaning) were

productos agrícolas, requiere del aislamiento de los analitos de la matriz y limpieza de los extractos antes de la determinación cromatográfica. En este estudio las dos etapas (extracción y limpieza) se combinaron en un solo paso, en consecuencia, el estudio de recuperación se realizó a través de análisis univariantes.

Método de extracción y de limpieza

Una porción representativa de la muestra fresca fue homogeneizada y una alícuota de 500mg se mezcló con 500mg de la fase dispersiva (previamente acondicionada) hasta obtener una dispersión seca y homogénea.

La dispersión de la muestra se transfirió a la columna de extracción de polipropileno (0,5 cm de diámetro por 7 cm de largo), previamente empacada con la fase de limpieza (acondicionada). Para la elución, se evaluaron diferentes sistemas y volúmenes de solventes (5, 10 y 15 mL), aplicando vacío, con el fin de obtener la mejor recuperación. Los extractos obtenidos se colectaron en tubos cónicos graduados de 15 mL y se concentraron en un evaporador con nitrógeno hasta un volumen de 2 mL.

Análisis cromatográfico de las muestras

Una porción de 1 μ L de los extractos fue directamente analizada en un cromatógrafo de gases, Perkin Elmer Autosystem[®] (Norwalk, USA), equipado con detector termiónico nitrógeno-fósforo, un inyector automático Perkin Elmer[®], operado en el modo splitless y una columna capilar DB-17 (30 m x 0,53 mm D.I) de 1 μ m de espesor de una película de 50% fenilmetilpolisiloxano, bajo las condi-

combined in one phase, therefore, the recovery research was done with an univariate analysis.

Extraction and cleaning-up method

A representative portion of the fresh sample was homogenized and an aliquot of 500mg was mixed with 500mg of the dispersive phase (previously prepared) until obtaining a dry and homogenous dispersion.

The dispersion of the sample was transferred to the poplirproline extracting column (0.5 cm of diameter per 7cm of length), previously stored with the clean-up phase (conditioned). For the elution, different systems and volumes of solvents were evaluated (5, 10 and 15 mL), and vacuum packed with the aim of obtaining the best recovery. The extracts obtained were collected in graduated conic tubes of 15mL and concentrated in an evaporator with nitrogen until reaching a volume of 2 mL.

Chromatographic analysis of the samples

A portion of 1 μ L of the extracts, was directly analyzed in a gas chromatograph, Perkin Elmer Autosystem[®] (Norwalk, USA), equipped with nitrogen-phosphorous-thermal-ion detector, with automatic injector Perkin Elmer[®], operated in the splitless mode and a capillary column DB-17 (30 m x 0.53mm D.I) of 1 μ m of a film's thickness of 50% phenyl methylpolysiloxane, under conditions already published by Ettiene *et al.* (2008). The chromatographic data was processed in a computer with Turbochrom[®] navigator, 4.1 (Perkin Elmer[®]).

Recovery study

For determining the extraction's efficiency, a portion of 500 mg of the

ciones publicadas por Ettiene *et al.* (2008). Los datos cromatográficos se procesaron en un computador equipado con el software Turbochrom® navigator versión 4.1 (Perkin Elmer®).

Estudio de recuperación

Para determinar la eficiencia de la extracción, una porción de 500mg de muestra se fortificó con 200 μL de la solución de adición estándar a dos niveles de concentración (1 y 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), almacenándola por un periodo de 30 minutos después de la adición, para que ocurrieran las interacciones de los plaguicidas con la matriz. Las muestras no fortificadas se emplearon como blancos. Las muestras fortificadas y no fortificadas se sometieron al método de extracción descrito anteriormente. Los datos obtenidos durante la optimización fueron analizados con estadística descriptiva considerando la media, desviación estándar relativa y coeficiente de correlación de las curvas de calibración de cada plaguicida. La precisión analítica, en términos de repetibilidad y reproducibilidad, se evaluó a través de las desviaciones estándares relativas (DER) para tres repeticiones.

Resultados y discusión

Validación

Los patrones para la curva analítica se prepararon en extracto blanco de la muestra para evitar el efecto matriz. Las curvas analíticas obtenidas mostraron satisfactoria linealidad para el intervalo de concentración evaluado (0,125–1,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) para los dos analitos: clorpyrifos ($y = 1,6574x - 0,0325$, $r = 0,9988$) y etil-paratión ($y = 0,913x - 0,075$, $r = 0,9991$) (análisis de

sample was fortified with 200 μL of the standard addition solution at two concentration levels (1 and 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), storing it for 30 minutes after the addition in order that the interaction of pesticides with the matrix could happen. Non fortified samples were employed as targets. Fortified and non fortified samples were submitted to the extraction method previously described. The obtained data during the optimization was analyzed with descriptive statistics considering the mean, relative standard deviation and correlation coefficient of the calibration curves of each pesticide. The analytical accuracy in terms of repeatability and reproducibility was evaluated through relative standards deviations (DER) for three replications.

Results and discussion

Validation

The patterns for the analytical curve were prepared in white extract to avoid the matrix effect. The analytical curves obtained showed satisfactorily linearity for the evaluated concentration interval (0.125–1.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for the analytes: chlorpyrifos ($y = 1.6574x - 0.0325$, $r = 0.9988$) and ethyl-parathion, ($y = 0.913x - 0.075$, $r = 0.9991$) (lineal analysis regression, $n = 3$), the analysis time did not exceed 32 minutes. The NPD response, in terms of sensitivity for the selected pesticides, is higher for chlorpyrifos compared to ethyl-parathion. On the other side, the detection limits of the method for the evaluated pesticides resulted to be chlorpyrifos (0.197 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and ethyl-parathion (0.172 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$); it is necessary to mention that there are not reports

regresión lineal, $n= 3$), el tiempo de análisis no excedió los 32 minutos. La respuesta del NPD, en términos de sensibilidad, para los plaguicidas seleccionados, es mayor para clorpirifos comparado con etil-paratión. Por otro lado, los límites de detección del método para los plaguicidas evaluados resultaron ser clorpirifos ($0,197 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y etil-paratión ($0,172 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$); es necesario destacar que no existen reportes de la FAO/OMS que referencie los límites máximos residuales (LMR) de estos plaguicidas en frutos de guayabo (*Psidium guajava* L.).

Optimización

Durante la optimización del método de DMFS, se evaluaron los siguientes parámetros analíticos: fase dispersiva o de extracción, fase de limpieza, naturaleza y volúmenes del sistema de solventes.

Selección de la Fase Dispersiva

La simplicidad es una de las características más atractivas de la DMFS y su éxito es principalmente afectado por el empaquetamiento de la columna y el procedimiento de elución, de tal manera, que el sorbente apropiado debe permitir la homogeneización y ruptura de la muestra, actuando al mismo tiempo como material de separación. En este trabajo, se evaluó una relación fase sólida/muestra de 1:1(m/m).

Para la selección de la fase dispersiva se evaluaron fases sólidas de naturaleza polar: alúmina, celite, sílice y florisil. Paralelamente, debido al carácter univariante del método, se evaluaron sistemas con fases de limpieza consistentes en: alúmina, celite, y florisil; empleando como solvente de

de FAO/OMS that highlight the maximum residual limits (LMR) of these pesticides in guava fruits (*Psidium guajava* L.).

Optimization

During the optimization of the DMFS method, were evaluated the following analytical parameters: dispersive or extraction phase, clean-up phase, nature and system's volume of the solvents.

Selection of the dispersive phase

Simplicity is one of the most attractive characteristics for DMFS and its success is mainly affected by packing the column and the elution procedure, in a way that the appropriate sorbent must allow the homogenization and rupture of the sample, acting at the same time as separation material. In this research was evaluated the relation solid phase/sample 1:1 (m/m).

For selecting the dispersive phase, were evaluated solid phases of the polar nature: alumina, celite, silica and florisil. At the same time, due to the univariate type of the method were evaluated systems with constant cleaning-up phases in alumina, celite and florisil, employing as elution solvent a binary mix of ethyl:acetone acetate (90:10% v/v). The results are presented in table 1.

It can be observe, in general terms, silica, celice and florisil, as solid foundations for the dispersion of guava fruits, showed the best recoveries for analytes and in all cases was observed the lowest recovery (< 64%) when employing alumina as dispersive phase, fact also reported by Tekel' and Hatrik (1996) assuring that polar pesticides and with mild polarity are

elución una mezcla binaria de acetato de etilo:acetona (90:10% v/v). Los resultados se presentan en el cuadro 1.

Puede observarse que, en términos generales, sílice, celite y florisil como fases sólidas para la dispersión de los frutos de guayaba mostraron las mejores recuperaciones para los analitos y en todos los casos se observó la menor recuperación (< 64%) al emplear alúmina como fase dispersiva, hecho que fue reportado por Tekel' y Hatrík (1996) asegurando que plaguicidas polares y de mediana polaridad no son cuantitativamente eluidos de columnas de alúmina neutra o ácida.

Se seleccionó florisil como sorbente de dispersión, debido a que las dispersiones obtenidas resultaron ser más secas, sueltas y homogéneas, y en consecuencia, más fáciles de manipu-

not quantitative eluted from neutral or acid alumina's columns.

Florisil was selected as dispersion sorbent, since the obtained dispersions resulted to be dryer and homogenous, consequently, easier to manipulate, besides the adequate recovery percentages obtained. Capriotti *et al.*, (2010) have reported that florisil is the sorbent with more attention in the multi-residual analysis of fruits and vegetables, due to its capacity of retaining some lipids and the generation of very clean extracts for the gas chromatography with electrochemical detection, nitrogen-phosphorous detection and flame photometric detection.

Selection of the clean-up phase

With the aim of enlarge the possibilities, the clean-up phase study was extended until the carbonacea phases and

Cuadro 1. Porcentajes de recuperación¹ de los plaguicidas organofosforados en muestras de guayaba obtenidos con diferentes fases dispersivas.

Table 1. Recovery percentages of organophosphorous percentages in guava samples obtained with different dispersive phases.

Fase dispersiva	Fase de limpieza					
	Alúmina		Celite		Florisil	
	C	P	C	P	C	P
Silice	22,07	22,36	77,00	81,52	89,16	94,23
Florisil	58,42	63,20	82,05	106,79	85,65	100,12
Alúmina	24,92	27,94	33,32	41,44	59,59	63,78
Celite	62,25	67,68	67,59	83,87	88,21	94,2

¹Valores medios (DER; n=3). C: clorpyrifos y P: paratión-etil. Fase dispersiva:500mg, fase de limpieza: 200mg+500mg de sulfato de sodio, solvente de elución 10mL acetato de etilo: acetona (90:10% v/v).

lar; esto aunado a los adecuados porcentajes de recuperación obtenidos. Capriotti *et al.* (2010) ha reportado que florisil es el sorbente que más atención ha ganado en el análisis multiresidual de frutas y vegetales, debido a la capacidad de retener algunos lípidos y a la generación de extractos muy limpios para la cromatografía de gases con detección electroquímica, detección nitrógeno-fósforo y detección fotométrica de llama.

Selección de la Fase de Limpieza

Con el objeto de ampliar el panorama de posibilidades, el estudio de la fase de limpieza se extendió a la evaluación fases carbonáceas y fases enlazadas polares y apolares, manteniendo constante la adición de 500mg de sulfato de sodio anhidro como agente desecante, para evitar la presencia de agua en los extractos y su incompatibilidad con el sistema de detección. Los resultados se muestran en el cuadro 2

Los sistemas carbonáceos (carbón grafitado y carbón activado) presentaron extractos totalmente incoloros. En el caso del carbón activado se disminuyó la polaridad del solvente de elución intentando recuperar cuantitativamente los analitos; sin embargo, no se obtuvo mejoras significativas debido posiblemente, a interacciones irreversibles (Wan y Wong, 1996), que se evidencia en la baja recuperación de los analitos en estudio.

Moral *et al.* (2006) reportaron que los sorbentes carbonáceos muestran efectos de adsorción irreversible para algunos plaguicidas; por tal motivo, el carbón activado como única fase de limpieza fue descartado.

polar and un-polar phases, keeping constant the addition of 500 mg of anhydrous sodium sulphate as desiccant agent to avoid the presence of water in the extracts and the incompatibility with the detection system. The results are shown in table 2.

Carbonaceous systems (graphite carbon and activated carbon) presented totally uncolored extracts. In the case of the active carbon, was reduced the polarity of the elution solvent trying to recover quantitative the analytes; however, none significant improvements were obtained maybe due to irreversible interactions (Wan and Wong, 1996), which are evidenced in the low recovery of analytes in the research.

Mora *et al.*, (2006) reported that carbonaceous sorbents show irreversible absorption effects for some pesticides, for this reason, the active carbon as only clean-up phase was discarded.

The use of florisil, alumina and the linking phases show very similar selections for chlorpyrifos and ethylparathion; however, was obtained a higher recovery of analytes when employed florisil compare to the linked phases and a lower standard deviation when compared to alumina, might be the latter (alumina) the second best option to be employed.

In function of the efficiency, selection of the extraction-clean up system and low cost, was selected florisil as cleaning-up phase, nevertheless, it was observed the presence of pigmentation in the extracts. To eliminate completely the pigments, was evaluated the influence of graphite carbon in the clean-up

Cuadro 2. Porcentajes de recuperación¹ de los plaguicidas organofosforados en muestras de guayaba obtenidos diferentes fases de limpieza en diferentes solvente de elución.

Table 2. Recovery percentages of organophosphorous pesticides in guava samples obtained in different clean-up phases in different elution solvents.

Plaguicida	Carbón activado		Carbón grafitado	Alúmina	
	A ²	HA 80:20 ²	EA 90:10 ²	EA 90:10 ²	EA 80:20 ²
Clorpyrifos	0,18(3,84)	7,03(3,84)	57,07(3,84)	58,42(23,47)	97,77(2,14)
Etil-paration	7,05(1,40)	7,63(1,79)	77,01(2,54)	63,20(23,35)	101,58(1,76)
Plaguicida	Florisil		Aminopropil	C-18	Diol
	EA 90:10 ²	EA 80:20 ²	EA 80:20 ²	EA 80:20 ²	EA 80:20 ²
Clorpyrifos	85,65(0,89)	94,53(0,79)	81,82(6,73)	85,58(5,18)	77,96(14,66)
Etil-paration	100,12(1,32)	104,61(1,05)	75,71(7,21)	77,72(8,76)	72,47(14,02)

¹Valores medios (DER; $n=3$). ²Sistema de elución. A: Acetona; HA: Hexano: Acetona; EA: Acetato de etilo: Acetona.; Fase dispersiva: 500 mg florisil, fase de limpieza: 200 mg+500 mg de sulfato de sodio, solvente de elución: 10 mL

El empleo de florisil, alúmina y las fases enlazadas muestran selectividades similares para clorpyrifos y etil-paratión; sin embargo, se obtuvo mayor recuperación de los analitos al emplear florisil en comparación con las fases enlazadas y una menor desviación estándar al comparar con alúmina, pudiendo ser esta (alúmina) una segunda opción a emplear.

En función de la eficiencia, selectividad del sistema de extracción- limpieza y bajo costo, se seleccionó florisil como fase de limpieza; no obstante, se observó la presencia de pigmentación en los extractos. Para eliminar completamente los pigmentos se evaluó la influencia del carbón grafitado en el sistema de limpieza, ya que este posee

system, since it has the property of absorbing the macro-molecules such as pigments, resins and lipids (Ahmed, 2001, Yan-Yun *et al.*, 2006).

In table 3 are presented the recovery percentages obtained with different quantities of florisil as clean-up phase and the effect of the incorporation of graphite carbon to it. For this type of matrix was necessary the employment of absorbent mixes of different nature with the aim of combining the properties of the hydrophilic absorbents and lipophilic carbonaceous.

Lehotav and Mastovska (2005) concluded that graphite carbon can be employed for the cleaning-up phase if there are not pesticides in the system

la propiedad de adsorber preferencialmente macromoléculas, tales como pigmentos, resinas y lípidos (Ahmed, 2001, Yan-Yun *et al.*, 2006).

En el cuadro 3 se presentan los porcentajes de recuperación obtenidos con diferentes cantidades de florisil como fase de limpieza y el efecto de la incorporación de carbón grafitado a la misma. Para este tipo de matriz fue necesario el empleo de mezclas de adsorbentes de diferente naturaleza, con la finalidad de combinar las propiedades de los adsorbentes hidrofílicos y carbonáceos lipofílicos.

Lehotay y Mastovska (2005) concluyeron que el carbón grafitado puede ser empleado para la limpieza, si en el sistema no existen plaguicidas que posean en su estructura anillos planos, ya que estos se retienen fuertemente al adsorbente impidiendo su elución. Las estructuras de los plaguicidas organofosforados evaluados no presentan anillos aromáticos planos, debido a la presencia de sustituyentes con efecto atractor de electrones que distorsionan la rigidez de los anillos aromáticos, por lo que en este caso, resultó adecuada su aplicación.

El empleo de sistemas de limpieza con mezclas de adsorbentes (florisil-carbón grafitado-sulfato de sodio) proporcionaron los mejores resultados considerando la apariencia de los extractos y los porcentajes de recuperación obtenidos, al ser eluido con acetato de etilo/acetona (80:20% v/v). El sistema de limpieza seleccionado como el más eficiente (200mg de florisil+50mg de carbón grafitado+500mg de sulfato de sodio) produjo desviaciones estándares relativas menores al 7%, indicando una alta precisión en términos de

that have flat rings in their structures, since these are strongly retained to the absorbent obstructing the elution. The structure of the evaluated organophosphorous pesticides does not have flat aromatic rings, due to the presence of substitutes with attractor effect of the electrons that distort the rigidity of the aromatic rings, therefore, its application resulted to be adequate.

The employment of cleaning-up systems with absorbent mixes (florisil-graphite carbon-sodium sulphate) provide the best results considering the appearance of the extracts and the recovery percentages obtained, when eluted with ethyl-acetone acetone (80:20% v/v). The cleaning-up system selected as the most efficient (200 mg of florisil+50 mg of graphite carbon+500 mg of sodium sulphate) produced standard deviations lower than 7%, indicating a high accuracy in terms of repeatability, which provides solid indications for posterior applications to pesticides with physicochemical properties similar under the optimized extraction-clean up conditions.

Effect of the modifiers on the selection of the elution solvent

Ethyl acetate is a commonly employed solvent for extracting pesticides in fruits and vegetables, since it has proved to be efficient as elution solvent; however, as an unique extraction solvent, it does not have the necessary elution strength to fulfill the complete desorption of the analytes in the column's system (Holstege *et al.*, 1994 cited by Anastassiades and Lehotay, 2003; Quintero *et al.*, 2008).

Cuadro 3. Porcentajes de recuperación¹ de los plaguicidas organofosforados en muestras de guayaba obtenido modificando la cantidad de la fase de limpieza.

Table 3. Recovery percentages of organophosphorous pesticides in guava samples obtained modifying the quantity of the clean-up phase.

Plaguicidas	Florisisil (EN 90:10, %v/v) ²			Florisisil (EA 80:20, %v/v) ²		
	0,2 g	0,5 g	0,2 g+0,1 g ³	0,2 g	0,5 g	0,2 g+0,05 g ³
Clorpirifos	71,85 (6,16)	64,59 (4,98)	59,37 (2,71)	94,53 (0,79)	70,44 (1,45)	97,29 (3,68)
Etil-paration	75,05 (10,29)	72,02 (15,65)	66,44 (3,18)	104,61 (1,05)	66,56 (2,15)	93,31 (6,88)

¹Valores medios (DER; n=3) ²Solvente de elución: EN: acetato de etilo; acetónitrilo; EA: acetato de etilo; acetona. ³Masa (g) de carbón grafitado

repetibilidad, lo cual, proporciona indicaciones sólidas para posteriores aplicaciones a insecticidas con propiedades físico- químicas similares bajo las condiciones de extracción- limpieza optimizadas.

Efecto de los modificadores sobre la selectividad del solvente de elución

El acetato de etilo es un solvente comúnmente empleado para la extracción de plaguicidas en frutas y vegetales, ya que ha mostrado ser eficiente como solvente de elución; sin embargo, como único solvente de extracción no posee la fuerza de elución suficiente para lograr la completa desorción de los analitos del sistema columnar (Holstege *et al.*, 1994 citado por Anastassiades y Lehotay, 2003; Quintero *et al.*, 2008).

Debido al carácter univariante del análisis se procedió a evaluar el efecto de los modificadores sobre la mejor condición, a fin de observar como este parámetro promueve la selectividad del solvente de elución. Para ello, la adición de una pequeña proporción (20%) de un solvente polar, tal como acetona y acetonitrilo, al acetato de etilo fue evaluado, los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 4.

Cuando la polaridad de la mezcla de elución se aumento, mediante la incorporación del acetonitrilo (agente modificador) se generó una disminución de la recuperación del etil-paratión, al ser comparada con la obtenida al adicionar acetona como modificador.

Evaluación del volumen del solvente de elución

En la figura 1 se presenta el efecto del volumen de solvente de elución en la recuperación (%R) de los POFs. Puede observarse que la mayor recu-

Due to the univariate condition of the analysis, it was proceeded to evaluate the effect of the modifiers on the best condition with the aim of observing how this parameter promotes the selectivity of the elution's solvent. For this reason, the addition of a small proportion (20%) of a polar solvent, such as acetone and acetonitrile, to the ethyl acetate was evaluated; the results obtained are shown in table 4.

When the polarity of the elution mix increased incorporating acetonitrile (modifier agent) was generated a reduction on the recovery of ethyl-parathion when compared to the one obtain when added acetone as modifier.

Volume evaluation of the elution solvent

In figure 1 is presented the volume effect of the elution in the recovery (%R) of POFs. It can be observe that the highest recovery of the analytes was obtained when employing a volume of 10mL of the binary mix of ethyl acetate: acetate (80:20% v/v), keeping practically constant the recovery when increasing the elution volume at 15 mL. Based on these results was selected 10 mL as optimum volume for the elution of the evaluated POFs.

Conclusions

DMFS as a proposed phase for the sample's treatment in the extraction of the evaluated pesticides resulted to be an effective technique and provides recovery levels and adequate standard deviations, considering the complexity of the matrix.

The combination of sorbent phases of polar distinction in the

Cuadro 4. Porcentajes de recuperación¹ de los plaguicidas organofosforados en muestras de guayaba obtenidos con diferentes solventes de elución.

Table 4. Recovery percentages of organophosphorous pesticides in guava samples obtained with different elution solvents.

Plaguicidas	Acetato de etilo: acetona (80:20% v/v)	Acetato de etilo	Acetato de etilo: acetonitrilo (80:20 %v/v)
Clorpirifos	97,2(3,68)	65,69(6,50)	97,21(5,98)
Etil-paration	93,31(6,88)	64,37(0,49)	70,43(8,11)

¹Valores medios (DER; n=3).

peración de los analitos se obtuvo al emplear un volumen de 10 mL de la mezcla binaria acetato de etilo: acetona (80:20% v/v), manteniéndose prácticamente constante la recuperación al aumentar el volumen de elución a 15mL. Basados en estos resultados se seleccionó 10 mL como volumen óptimo para la elución de los POFs evaluados.

dispersive phase and non-polar in the cleaning-up phase allowed extracts free of pigmentation in this type of matrix, avoiding interfering potentials in the injection (liner injector) of the GC equipment.

It was proved that a solvent with intermediate strength, as in the case of ethyl acetate, resulted of optimum extractive selectivity when employed

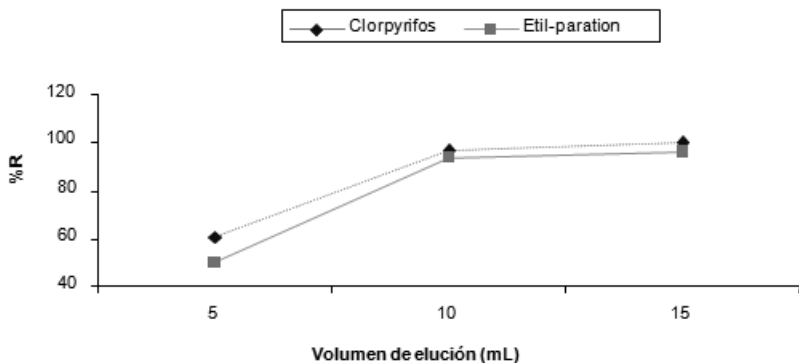


Figura 1. Efecto del volumen de solvente de elución en la recuperación de los plaguicidas organofosforados.

Figure 1. Volume effect of the elution solvent in the recovery of organophosphorous pesticides.

Conclusiones

La DMFS como una etapa propuesta para el tratamiento de muestra en la extracción de los plaguicidas evaluados, resultó una técnica efectiva y proporciona niveles de recuperación y desviaciones estándares adecuadas, tomando en consideración la complejidad de la matriz.

La combinación de fases sorbentes, de carácter polar en la fase dispersiva, y no polar-polar en la fase de limpieza, permitió extractos libres de pigmentación en este tipo de matriz, evitando potenciales interferentes en el inyector (injector liner) del equipo GC.

Se demostró que un solvente de fuerza intermedia, como es el caso del acetato de etilo, resultó de óptima selectividad extractiva al emplearse como solvente principal en mezclas binarias. Estas mezclas maximizan su selectividad al emplearse con solventes de baja polaridad.

Literatura citada

- Ahmed, F. 2001. Analyses of pesticides and their metabolites in food and drink. *Trends Anal. Chem.* 20(11):649-661
- Albero, B., C. Sánchez-Brunete y J. Tadeo. 2003. Determination of organophosphorus pesticides in fruit juices by Matrix Solid-Phase Dispersion and Gas Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 51:6915-6921.
- Anastassiades, M. y S. Lehotay. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of residues in produce. *J. AOAC Int.* 86(2):412-431.
- Barker, S., A. Long and C. Short. 1989. Isolation of drug residues from tissue as main solvent in binary mixes. These mixes maximize their selections when employed to low polarity solvents.
- by solid phase dispersion. *J. Chromatogr. A.* 475(2):353-361.
- Barker, S. 2000. Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *J. Chromatogr. A.* 880:63-68
- Blanco, E., M. Casais, M. Mejuto y R. Cela. 2006. Approaches for the simultaneous extraction of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A and related phenolic compounds from sewage sludge and sediment samples based on matrix solid-phase dispersion fruit. *Anal. Chem.* 78(8):2772-2778.
- Capriotti, A., C. Cavaliere, P. Giansanti, R. Gubbiotti, R. Samperi y A. Laganà. 2010. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *J. Chromatogr. A.* 1217:2521-2532.
- Chai, A., L. Kuet y L. Seng. 2004. Solid-phase extraction cleanup method for the determination of organophosphorus pesticides in vegetables. *J. Chem. Mala.* 6(1):029-038.
- Chavarri, M., A. Herrera y A. Ariño. 2004. Pesticides residues in field-sprayed and processed fruit and vegetables. *J. Sci Food Agric.* 84:1253-1259.
- Díez, C., W. Traag, P. Zommer, P. Marinero y J. Atienza. 2006. Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and «dispersive solid-phase extraction» method with classical multi-residue method for the herbicide residues in barley samples. *J. Chromatogr. A.* 1131:11-23.
- Ettiène, G., S. Ortega, D. Medina, J. Sepúlveda y L. Sandoval. 2008. Optimización y validación de un método de extracción y limpieza en fase sólida para la determinación de insecticidas organofosforados en cebollín (*Allium fistulosum* L.) y cilantro (*Coriandrum sativum* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ).* 25:550-569.

End of english version

- García de Llasera, M., Gómez-Almaraz, L. Vera-Avila y A. Peña-Alvarez. 2005. Matrix solid-phase dispersion extraction and determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in tomato fruit. *J. Chromatogr. A.* 1093:139-146.
- Geraud-Pouey, F., D. Chirinos y G. Romay. 2001. Efecto físico de las exfoliaciones de la corteza del guayabo (*Psidium guajava*) sobre *Capulinia* sp. cercana a *jaboticabae* von Ihering (Hemiptera: Eriococcidae). *Entomotropica.* 16(1):21-27
- Kristenson, E., G. Haverkate, C. Slooten, L. Ramos, R. Vreuls y U. Brinkman. 2001. Miniaturized automated matrix solid-phase dispersion extraction of pesticides in fruit followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. A.* 917:277-286
- Kristenson, E., L. Ramos y U. Brinkman. 2006. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trends Anal. Chem.* 25(2):96-111.
- Lehotay, S. y K. Mastovska. 2005. Evaluation of two phase and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *J. AOAC Int.* 88(2)630-638.
- Moral, A., M. Sicilia, S. Rubio y D. Pérez-Bendito. 2006. Sodium dodecyl sulphate-coated alumina for the extraction/preconcentration of benzimidazolic fungicides from natural waters prior to their quantification by liquid chromatography/fluorimetry. *Anal. Chim. Acta.* 569: 132-138.
- Morzycka, B. 2002. Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *J. Chromatogr. A.* 982:267-273.
- Ochiai, N., K. Sasamoto, H. Kanda, T. Yamagami, F. David, B. Tienpont y P. Sandra. 2005. Optimization of a multi-residue screening method for the determination of 85 pesticides in selected food matrices by stir bar sorptive extraction and thermal desorption GC-MS. *J. Sep. Sci.* 28:1083-1092
- Picó, J., y Y. Font. 2003, Revisión de los métodos de determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en alimentos. *Rev. Toxicol.* 20:166-175
- Quintero, A., M. Caselles, G. Ettiene, N. Colmenares, T. Ramirez y D. Medina. 2008, Monitoring of organophosphorus pesticide residues in vegetables of a agricultural area in Venezuela, *Bull. Environ Contam Toxicol.* 81:393-396.
- Thurman, E. y M. Mills. 1998. Solid-phase extraction: Principles and practice. Canada, Chemical analysis. Wiley-interscience. pp 147
- Torres, C., J. Picó, M. Redondo y J. Mañes. 1996. Matrix solid-phase dispersion extraction procedure for multiresidue pesticide analysis in oranges. *J. Chromatogr. A.* 719:95-103.
- Tekel, J. y S. Hatrík. 1996. Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods: clean-up procedures and selective detectors. *J. Chromatogr. A.* 754:397-410.
- Viana, E., J. Moltó, y Y. Font. 1996. Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the analysis of pesticides residues in vegetables. *J. Chromatogr. A.* 754:437-444
- Wan, H. y M. Wong. 1996. Minimization of solvent consumption in pesticide residue analysis. *J. Chromatogr. A.* 754:43-47.
- Yan-Yun H., Z. Ping, Z. Zhao-Xiang y H. You-Zhao. 2006. Determination of aflatoxins in high-pigment content samples by matrix solid-phase dispersion and high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food chem.* 54:4126-4130.
- Zhao, M., F. van der Wielen y P. de Voogt. 1999. Optimization of a matrix solid-phase dispersion method with sequential clean-up for the determination of alkylphenol ethoxylates in biological tissues. *J. Chromatogr. A.* 837:129-138.