

Método multiresidual simplificado para la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en vegetales

Simplified multiresidue method for determining organophosphorus pesticide residues in vegetables

A. Quintero¹, J. Caselles², G. Ettiene³, N. G. de Colmenares¹, y J. Pallares¹

¹Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET), Decanato de Investigación, Laboratorio de Fitoquímica. San Cristóbal, República Bolivariana de Venezuela.

²Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), ETSII, Departamento de Química Aplicada a la Ingeniería. Madrid, España.

³Universidad del Zulia, Facultad de Agronomía, Departamento de Química. Maracaibo, República Bolivariana de Venezuela.

Resumen

Se optimizó y validó un método analítico multiresidual para la determinación de siete plaguicidas organofosforados (metamidofos, diazinón, dimetoato, paratión-metil, clorpirifos, malatión y tetraclorvinfos) en seis vegetales (papa, cebolla, tomate, pimentón, lechuga y cebollín), cultivados en el Municipio José María Vargas, Estado Táchira, República Bolivariana de Venezuela. La extracción de los plaguicidas se realizó con una mezcla de acetato de etilo-acetona a dos concentraciones (80:20 y 90:10 %v/v) y la determinación analítica, por cromatografía de gases con detector de nitrógeno-fósforo. La identificación de los compuestos se basó en el tiempo de retención. La eficiencia de la extracción se evaluó mediante la fortificación de las muestras vegetales y pruebas de recuperación a dos niveles de enriquecimiento (0,05 y 0,1 mg.kg⁻¹). Las recuperaciones promedio oscilaron entre 70-110% con desviaciones estándar menores de 12%, el rango lineal se ubicó entre 0,01 y 1,0 mg.kg⁻¹. Los límites de detección oscilaron entre 0,011 y 0,032 mg.kg⁻¹, valores inferiores a los límites máximos de residuos establecidos. El método propuesto es un procedimiento eficiente, económico y de bajo impacto ambiental, que puede ser utilizado para análisis rutinarios de plaguicidas organofosforados en hortalizas.

Palabras clave: Análisis multiresidual, plaguicidas organofosforados, vegetales, cromatografía de gases

Recibido el 8-9-2011 • Aceptado el 18-1-2013

Autor de correspondencia e-mail: americaquintero@gmail.com

Abstract

An analytical multiresidue method for the simultaneous determination of seven organophosphorous pesticides (methamidophos, diazinon, dimethoate, parathion-methyl, chlorpyrifos, malathion and tetrachlorvinphos) in vegetables (potato, onion, tomato, red pepper, lettuce and green onion), cultivated in José María Vargas County, Táchira State in the Bolivarian Republic of Venezuela, was developed. The pesticides were extracted with ethylacetate/acetone at two concentrations (80:20 and 90:10 v/v). Final determination of the analytes was made by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. The identification of compounds was based on the retention time. The extraction efficiency was evaluated by the fortification of vegetables samples, and recovery studies were performed at two levels of enrichment (0.05 and 0.1 mg.kg⁻¹). Recoveries obtained ranged from 70% to 110% with relative standard deviations lower than 12%. The method showed good linearity over the range assayed 0.01 and 1.0 mg kg⁻¹ and the detection limits were between 0.011 and 0.032 mg.kg⁻¹. The proposed analytical method could be used as an efficient, cheap and low environmental impact procedure in routine determinations of organophosphorous pesticides in vegetables.

Key words: analytical multiresidue; pesticides; vegetables; gas-chromatography.

Introducción

La toxicidad de los plaguicidas presentes en el ambiente, la exigencia de la sociedad en cuanto al control de todo tipo de contaminantes, así como el establecimiento de legislaciones restrictivas sobre los niveles de residuos tóxicos en diferentes matrices, conduce a la necesidad de disponer de métodos confiables, rápidos, económicos y suficientemente sensibles, que permitan el control de estas sustancias en diversos tipos de muestras. Los métodos de análisis desarrollados en las últimas décadas para la determinación de residuos de plaguicidas en frutas y vegetales, emplean metodologías multiresiduales que permiten la determinación simultánea de los plaguicidas a bajas concentraciones, con etapas básicas de

Introduction

The toxicity of the pesticides present on the environment, the exigency of the society regarding the control of all types of contaminants, as well as the establishment of restrictive legislations on the levels of toxic residues in different matrixes, conduct to the necessity of using trustable, fast, cheap and sensitive methods that allow the control of these substances in diverse types of samples. The analysis methods, developed on the last decades, for determining the pesticides residues in fruits and vegetables employ multiresidue methodologies that permit the simultaneous determination of pesticides at low concentrations, with basic extraction, purification and quantification phases (Pihlström *et al.*, 2007).

extracción, purificación y cuantificación (Pihlström *et al.*, 2007).

Los plaguicidas organofosforados (OPs) son ampliamente empleados en la agricultura debido a su alta efectividad, bajo costo y menor capacidad de bioacumulación. Venezuela basa parte de su economía en la producción agrícola, y el uso de los plaguicidas se ha convertido en una necesidad para la producción de los cultivos de vegetales y frutas. En este sentido, es urgente la implementación de métodos simplificados de análisis y programas de monitoreo de residuos de plaguicidas en alimentos, que aseguren la protección del consumidor. Monitoreos realizados en la zona de estudio demostraron la presencia de residuos de plaguicidas en vegetales de consumo diario en la dieta del venezolano (Quintero *et al.*, 2008).

En la literatura se reporta gran diversidad de métodos para el aislamiento y cuantificación de plaguicidas organofosforados en frutas y vegetales, y un desarrollado campo de estudio basado generalmente en la aplicación de técnicas cromatográficas (Sharma *et al.*, 2010). La naturaleza de la matriz y las características de los analitos son factores determinantes para la selección de la técnica más adecuada para preparar extractos aptos para su análisis instrumental, ya que no existe un método universal aplicable a todo tipo de muestra.

Los procesos de separación de mayor aplicación, para la preparación de muestras en frutas y vegetales, son: extracción líquido-líquido (Berrada *et al.*, 2010), extracción en fase sólida (Ravelo *et al.*, 2008), dispersión de

Organophosphorous pesticides (OPs) are widely employed in the agriculture due to their high accuracy, low cost and lower bioaccumulation capacity. Part of the economy in Venezuela is based on the agriculture production, and the use of the pesticides has become a necessity for the production of vegetables and fruits crops. On this sense, it is very important to implement simplified analysis methods and monitoring program of pesticide residues in food that guarantee the protection of the consumer. Monitors done in the field area proved the presence of pesticides residues of daily consumption in the diet of the Venezuelan (Quintero *et al.*, 2008).

In the literature, diversity of methods are reported for the isolation and quantification of organophosphorous pesticides in fruits and vegetables, and a developed research field mainly based on the application of chromatography techniques (Sharma *et al.*, 2010). The nature of the matrix and the characteristics of the analytes are determining factors for the selection of the most adequate technique to prepare apt extracts for their instrumental analysis, since there is not a universal method applicable to all types of samples.

The dividing processes with greater application for the preparation of samples in fruits and vegetables are: liquid-liquid extraction (Berrada *et al.*, 2010), extraction in solid phase (Ravelo *et al.*, 2008), matrix dispersion in solid phase (Radišić *et al.*, 2009), micro-extraction in solid phase (Fytianos *et al.*, 2007), ultrasonic extraction (Ettiene *et al.*, 2010) and extraction with super critical fluids (Sobhanzadeh *et al.*, 2009). The application of different

matriz en fase sólida (Radišić *et al.*, 2009), microextracción en fase sólida (Fytianos *et al.*, 2007), extracción ultrasónica (Ettiene *et al.*, 2010) y extracción con fluidos supercríticos (Sobhanzadeh *et al.*, 2009). La aplicación de diferentes métodos cromatográficos para la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos han sido publicados: cromatografía de gases con detectores específicos tales como fotométrico de llama (Bai *et al.*, 2006), nitrógeno-fósforo (Quintero *et al.*, 2008), captura electrónica (Amvrasi y Tsiropoulos, 2009) y más recientemente, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y doble espectrometría de masas (Mezcua *et al.*, 2009), que permiten confirmar la identidad de los plaguicidas en las matrices. La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas y doble espectrometría de masas es usada para la determinación de plaguicidas polares no volátiles y térmicamente inestables (Kruve *et al.*, 2008; Radišić *et al.*, 2009).

Nuevas técnicas de extracción y cuantificación, que supongan una reducción en el proceso de preparación de la muestra, consumo de disolventes en la extracción y el tiempo de análisis, son de gran interés para el desarrollo de métodos analíticos rápidos, de alta fiabilidad y menos contaminantes. El objetivo de este estudio consistió en desarrollar una metodología multiresidual simplificada basada en extracción líquido-líquido y cuantificación por cromatografía de gases con detector de nitrógeno-fósforo para la determinación de residuos de OPs (metamidofos, diazinon, dimetato, paratión-metil, clorpyrifos,

chromatography methods for the determination of pesticides residues in food have been published: gases chromatography with specific detectors such as flame photometric (Bai *et al.*, 2006), nitrogen-phosphorous (Quintero *et al.*, 2008), electrical capture (Amvrasi and Tsiropoulos, 2009) and more recently, gas chromatography attached to masses spectrometry and double spectrometry of gasses (Mezcua *et al.*, 2009), that allow confirming the identity of pesticides in the matrixes. The liquid chromatography attached to mass spectrometry and double spectrometry of gasses is used for determining the non volatile polar pesticides and thermally unsteady (Kruve *et al.*, 2008; Radišić *et al.*, 2009).

New extraction and quantification techniques, that suppose a reduction in the preparation process of the sample, consumption of dissolvent in the extraction and the analysis of the time, are very important for the development of fast, trustable and less pollutant analytical methods. The objective of this research consisted on developing a simplified multiresidual methodology, based on the liquid-liquid extraction for the determination of OPs residues (methamidophos, diazinon, dimethoate, parathion-methyl, chlorpyrifos, malathion and tetrachlorvinphos) frequently employed in vegetable crops regularly produced in Venezuela.

Materials and methods

Reactive, solvents and vegetal samples

Standards of methamidophos, diazinon, dimethoate, parathion-methyl, chlorpyrifos, malathion and

malatión y tetraclorvinfos) empleados de manera frecuente en el cultivo de vegetales producidos regularmente en Venezuela.

Materiales y métodos

Reactivos, solventes y muestras vegetales

Se emplearon estándares de los plaguicidas metamidofos, diazinón, dimetoato, paratión-metil, clorpirifos, malatión y tetraclorvinfos con una pureza $\geq 92,5\%$ (Dr. Ehrenstorfer®, Alemania). Soluciones madre de cada plaguicida ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) se prepararon en acetato de etilo grado HPLC (Baker®, USA). Una solución intermedia de la mezcla de plaguicidas ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) se preparó en acetato de etilo. Las soluciones se refrigeraron a -18°C . Como estándar interno se empleó el trifenilfosfato (99,5%, Riedel de Haën®, Alemania). Acetona, acetato de etilo y sulfato de sodio anhidro, grado reactivo fueron usados en la extracción y preparación de la muestra.

Matrices agrícolas de papa (*Solanum tuberosum*), cebolla (*Allium cepa*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), pimentón (*Capsicum annum*), lechuga (*Lactuca sativa*) y cebollín (*Allium fistulosum*) colectadas en parcelas experimentales donde se aplicó control biológico como sistema de protección natural de los cultivos, se emplearon para la preparación de muestras blanco y fortificadas.

Optimización de la extracción con disolventes orgánicos

El acetato de etilo (parcialmente miscible en agua y de baja toxicidad), modificado por la adición de acetona para incrementar su polaridad, fue la

tetrachlorvinphos pesticides were employed with a pureness $\geq 92.5\%$ (Dr. Ehrenstorfer®, Germany). Concentrated mother solutions of each pesticide ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were prepared in ethyl acetate HPLC (Baker®, USA). An intermediate solution of the pesticides mix ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was prepared in ethyl acetate. The solutions were refrigerated at -18°C . Triphenyl phosphate (99.5%, Riedel de Haën®, Germany) was employed as internal standard. The reactive acetone, ethylacetate and anhydrous sodium sulfate were used in the extraction and preparation of the sample.

Agriculture matrixes of potato (*Solanum tuberosum*), onion (*Allium cepa*), tomato (*Lycopersicon esculentum*), pepper (*Capsicum annum*), lettuce (*Lactuca sativa*) and chives (*Allium fistulosum*) collected in experimental plots, where was applied biological control as natural protection system of the crops, were used for the preparation of blank and fortified samples.

Extraction optimization with organic dissolvent

Ethyl acetate (partially miscible in low toxicity water) modified by adding the acetone to increment its polarity, was the mix selected as starting point for this research. The efficiency in the recovery of OPs with ethyl-acetone acetate in two proportions (80:20 and 90:10% v/v) was evaluated.

A representative sample of each vegetal species (200g) was disintegrated in a food processor Oster® brand, with 500g of its capacity. Sub-samples were weighted (4.0 g) by triplicate. Ethylacetate-acetone (80

mezcla seleccionada como punto de partida en esta investigación. La eficiencia en la recuperación de los OPs con soluciones de acetato de etilo-acetona en dos proporciones (80:20 y 90:10% v/v) fueron evaluadas.

Una muestra representativa de cada especie vegetal (200 g) fue desintegrada en un procesador de alimentos Marca Oster® de 500 g de capacidad. Sub-muestras fueron pesadas (4,0 g) por triplicado. Soluciones (10,0 mL) de acetato de etilo/acetona (80 y 90% v/v) se emplearon para extraer los OPs; una porción (5,0 g) de sulfato de sodio anhidro, se utilizó para eliminar residuos de agua. La mezcla se sometió a agitación magnética (10 min) y luego, se mantuvo en reposo (10 min) hasta lograr la separación de los solventes y la materia orgánica. Los extractos obtenidos se concentraron hasta un volumen final de 2,0 mL y seguidamente, 1,0 mL, fue transferido a un vial al cual se le adicionó 1,0 µL de trifenilfosfato (estándar interno). Posteriormente, se inyectaron por duplicado (1,0 µL) en el cromatógrafo de gases para la separación y cuantificación. La figura 1, muestra el esquema del proceso de extracción, concentración y análisis empleado.

Optimización de las condiciones instrumentales

Para la identificación de los OPs y el estándar interno se empleó un cromatógrafo de gases Perkin Elmer®, modelo Autosystem, equipado con un detector de nitrógeno fósforo (GC-NPD), un inyector automático operado en el modo splitless, un muestreador automático Perkin-Elmer® y una columna capilar de 30 m x 0,53 mm x 1,2 µm de espesor, de 50% metil polisiloxano, DB-17 (J & W Scientific®, USA).

and 90% v/v) were employed to extract the OPs, a portion (5.0 g) of anhydrous sodium sulfate was used for eliminating water residues.

The mix was submitted to magnetic agitation (10 min), later, it kept in stand by for ten minutes until obtaining the separation of the solvents and the organic matter. The extracts obtained were concentrated until a final volume of 2.0 mL, followed by 1.0 mL, later transferred to a vial, to which were added 1.0 µL of triphenyl phosphate (internal standard). Subsequently, were injected by duplicate (1.0 µL) in the gas chromatograph for the division and quantification. Figure 1 shows the process scheme of extraction, concentration and analysis employed.

Optimization of instrumental conditions

For identifying the OPs and the internal standard, a gas chromatograph Perkin Elmer®, Autosystem model was used, equipped with a nitrogen phosphorous detector (GC-NPD), an automatic injector operated in the splitless mode, an automatic sampler Perkin-Elmer® and a capillary column of 30 m x 0.53 mm x 1.2 µm of thickness, of 50% methyl polysiloxane DB-17 (J & W Scientific®, USA).

The optimum parameters of operation established for the simultaneous separation of OPs and the internal standard were: temperature of the injector 250°C; temperature program for the oven 60°C for 0.80 min; 40°C.min⁻¹ until 160°C; 3.5°C.min⁻¹ until 230°C; 5°C.min⁻¹ until 250°C, this temperature kept for 4 min, flow of carrier gas (He),

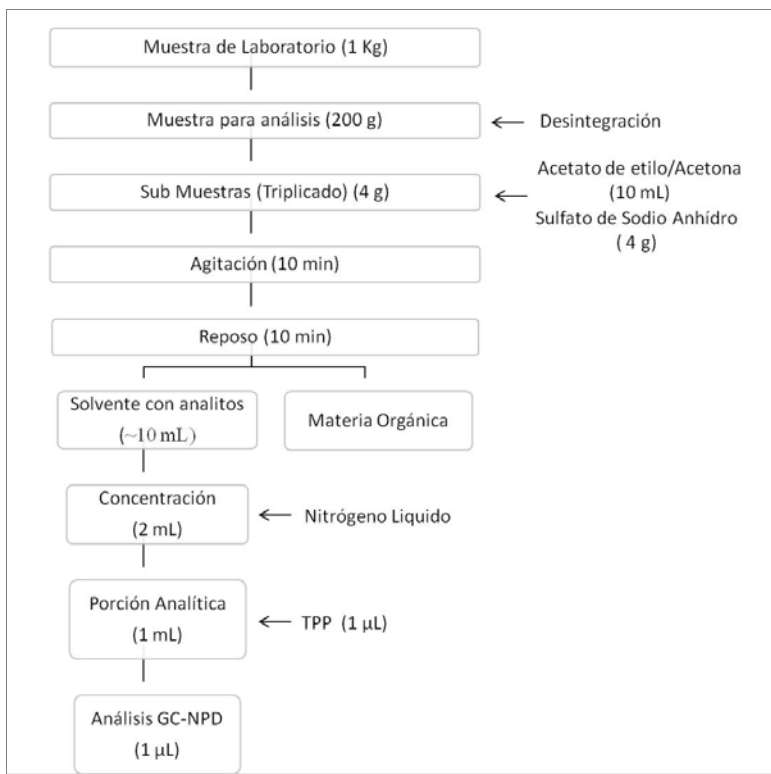


Figura 1. Proceso de extracción, concentración y análisis de los plaguicidas organofosforados.

Figure 1. Extraction, concentration and analysis process of organophosphorous pesticides.

Los parámetros óptimos de operación establecidos para la separación simultánea de los OPs y el estándar interno fueron: temperatura del inyector 250°C; programa de temperatura para el horno: 60°C durante 0,80 min; 40°C.min⁻¹ hasta 160°C; 3,5°C.min⁻¹ hasta 230°C; 5°C.min⁻¹ hasta 250°C, temperatura esta que se mantuvo por 4 min; flujo del gas de arrastre (He), 10 mL.min⁻¹; flujo del gas detector, (H₂) 2 mL.min⁻¹; aire a 100 mL.min⁻¹ con un umbral de 0,75 mV.

10 mL.min⁻¹; flow of gas detector, (H₂) 2 mL.min⁻¹; air at 100 mL.min⁻¹ with a threshold of 0.75 mV.

The identification of the OPs was done based on the retention times obtained for each of the OPs on the optimum job conditions. The chromatography data were processed in a computer equipped with Turbochrom Navigator 4 software.

Statistical analysis

The experimental results were expressed as the mean ± relative stan-

La identificación de los OPs se realizó con base en los tiempos de retención obtenidos para cada uno de ellos en las condiciones óptimas de trabajo. Los datos cromatográficos fueron procesados en un computador equipado con un software Turbochrom Navigator 4.

Análisis Estadístico

Los resultados experimentales se expresaron como la media \pm desviación estándar relativa (DER) de tres determinaciones. Startgraphics Plus versión 4.1, STSC. Inc. de gráficos estadísticos Corporation (1999); se utilizó para el análisis de varianza (ANOVA). Los valores de $P < 0,05$ fueron considerados significativos.

Resultados y discusión

Optimización de la extracción con disolventes orgánicos

El desarrollo del procedimiento de extracción se basó en varios criterios, que incluyeron: evitar el uso de solventes peligrosos o de costosa eliminación; seleccionar un solvente lo suficientemente polar para extraer los plaguicidas más polares y a la vez ser inmisible en agua para evitar la etapa de fraccionamiento y obtener un extracto final conteniendo todos los plaguicidas de interés con un mínimo de coextractos de la matriz. Por ello solventes halogenados y acetonitrilo no se consideraron por su toxicidad. Así mismo, mezclas constituidas por agua y solventes tales como acetona, etanol, metanol no se consideraron por su miscibilidad en agua. Estudios realizados demuestran que la mezcla acetato de etilo-acetona puede emplearse para la extracción sin

dard deviation (DER) of three determinations. Startgraphics Plus 4.1, STSC. Inc. of statistical Graphic Corporation (1999) was used for the variance analysis (ANOVA). The $P < 0.05$ values were considered significant.

Results and discussion

Optimization of the extraction with organic dissolvent

The development of the extraction process based on different criteria that included: to avoid the use of dangerous solvent or expensive elimination, to select a solvent which is polar enough to extract the most polar pesticides and at the same time, to be immiscible in water to avoid the fractioning phase and obtain a final extract containing all the pesticides with a minimum of co-extracts of the matrix. Thus, halogenated and acetonitrile solvents were not considered by their toxicity. Likewise, mixes constituted by water and solvents such as acetone, ethanol, methanol were not considered by their water miscibility. Researches carried out show that ethylacetate acetate might be employed for the extraction without the dividing phase (Ettiene *et al.*, 2006).

Ethylacetate acetate, mix in both of the proportions used (80:20 and 90:10% v/v), showed to be different in the extraction of the studied polar and non polar OPs. The addition of acetone increased the polarity of ethyl acetate and optimized the recovery of OPs polar, without needing the fractioning phase.

The best recoveries were obtained with the proportion 90:10 %v/v in the

la etapa de partición (Ettiene *et al.*, 2006).

La mezcla acetato de etilo-acetona, en las dos proporciones usadas (80:20 y 90:10% v/v), demostró ser eficiente en la extracción de los OPs estudiados, tanto polares como no polares. La adición de acetona incrementó la polaridad del acetato de etilo y optimizó la recuperación de los OPs polares, sin necesidad de la etapa de fraccionamiento.

Las mejores recuperaciones fueron obtenidas con la proporción 90:10 %v/v en los vegetales objeto de estudio, debido posiblemente, a su capacidad para extraer los analitos polares y no polares (cuadro 1), por lo que se optó por emplear la citada proporción. Este procedimiento fácil y sencillo repercutió favorablemente en una disminución de la cantidad de solvente empleado, tiempo de análisis y disminución de costos.

Estudios previos demuestran la eficiencia en la extracción de OPs en vegetales empleando acetato de etilo-acetona 90:10% v/v (Prieto *et al.*, 2002; Ettiene *et al.*, 2006), seguido de un proceso de limpieza en fase sólida. Sin embargo, en esta investigación no fue necesaria la limpieza de las muestras posterior a la extracción.

Cromatografía de gases con detector de nitrógeno-fósforo (GC-NPD)

La gran sensibilidad del detector GC-NPD por los compuestos organofosforados, hizo posible la cuantificación de los plaguicidas en las muestras objeto de este estudio. El programa de temperatura empleado para el horno, arrojó una alta resolución entre los picos (n=8) de interés. Bajo las condi-

vegetables to be studied, mainly due to their capacity of extracting the polar and unpolar analytes (table 1), thus, was decided to employ the cited proportion. This easy and simple procedure influenced positively in a reduction on the quantity of the solvent employed, time of the analysis and reduction of the expenses.

Previous researches prove the efficiency on the extraction of OPs in vegetables employing ethylacetate acetate 90:10% v/v (Prieto *et al.*, 2002; Ettiene *et al.*, 2006), followed by a clean-up process in solid phase. However, on this research was not necessary the clean-up process of samples posterior to the extraction.

Gas chromatography with nitrogen-phosphorus detector (GC-NPD)

The sensitivity of the GC-NPD detector by the organophosphorous compounds made possible the quantification of the pesticides in the samples studied. The temperature program employed for the oven, showed a high resolution between peaks of interests (n=8). Under the described chromatography conditions, the pesticides were eluted between 6.9 and 31.3 min. The relatively short time for the chromatographic time was one of the most considerable aspects for the selection of these parameters. The use of the capillary column DB-17 was especially useful in the separation of all the studied OPs. In general, continuous chromatographic analyses, a better resolution between the peaks and little interference were possible with a minimum of the personnel and in less time.

Cuadro 1. Recuperación promedio (%) de plaguicidas organofosforados en vegetales con diferentes proporciones del solvente.

Table 1. Average recovery (%) of organophosphorous pesticides in vegetables with different proportions of the solvent.

Plaguicida	Porcentaje de Recuperación											
	Papa		Cebolla		Tomate		Pimentón		Lechuga		Cebollín	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Methamidofos	91	85	90	78	94	87	92	90	77	72	77	81
Diazinón	83	84	100	92	94	90	83	86	80	80	91	84
Dimetoato	94	90	93	82	94	82	96	90	84	77	98	96
Paratión-metil	100	94	98	93	100	102	96	78	89	80	107	04
Clorpirifos	104	98	102	104	107	104	90	78	89	87	97	83
Malatión	109	100	104	97	102	97	110	107	95	91	101	03
Tetraclorvinfos	98	98	96	94	100	94	102	99	89	82	96	89

Solvente acetato de etilo-acetona: a) 90:10 v/v b) 80:20 v/v
 Nivel de fortificación: 0,1 mg.kg⁻¹

ciones cromatográficas descritas, los plaguicidas fueron eluidos entre 6,9 y 31,3 min. El tiempo relativamente corto para el análisis cromatográfico fue uno de los aspectos considerados en la selección de estos parámetros. El uso de la columna capilar DB-17 fue especialmente útil en la separación de todos los OPs estudiados. En general análisis cromatográficos continuos, una mejor resolución entre los picos y pocas interferencias fueron posibles con un mínimo de personal y en el menor tiempo.

Validación del método

Los parámetros de calidad fueron evaluados luego de comprobar la ausencia de los plaguicidas seleccionados en los vegetales estudiados.

Selectividad: para la evaluación de este parámetro se realizaron análisis cromatográficos a extractos de papa, cebolla, tomate, pimentón, lechuga y cebollín (matriz blanco), sin detectar señales que interfirieran con los tiempos de retención de los analitos. Se analizaron también extractos de los vegetales mencionados fortificados con una solución de los plaguicidas ($0,50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y con el estándar interno ($0,46 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), obteniéndose una señal diferenciada para cada compuesto. En la figura 2 se muestra un cromatograma del extracto blanco y de la muestra de tomate fortificada a manera de ejemplo.

La ausencia de señales cromatográficas en el tiempo de retención de los OPs estudiados en las muestras blanco, sugiere la inexistencia de compuestos en las matrices que pudieran dar una señal falso positiva, por lo que no se requiere un procedimiento de limpieza en los extractos. En las muestras fortificadas, la metodología demostró ser selectiva ya que permi-

Validation of the method

The quality parameters were evaluated after testing the absence of the pesticides selected in the studied vegetables.

Selectivity: for evaluating this parameter, were done the chromatographic analyses at extracts of potato, onion, tomato, pepper, lettuce and chive (blank matrix), without detecting signs that interfere with the retention limits of the analytes. Also, were analyzed extracts of the vegetables mentioned, fortified with a pesticide solution ($0.50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and with the internal standard ($0.46 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), obtaining a differential signal for each compound. In figure 2, is shown a chromatogram of the blank solution and the fortified tomato sample as an example.

The absence of chromatographic signs in the retention time of OPs studied in blank samples, suggest the inexistence of compounds in the matrixes that might lead to a false positive sign, thus, a clean-up procedure in the extracts is not required. In the fortified samples, the methodology proved to be selective since it allows dividing adequately and without the signs of the analyzed OPs and the internal standard. The GC-NPD analysis in extracts of blank samples of lettuce, tomato and pepper without cleaning up, confirming the absence of interference by co-extracts, have been reported by other authors (Fenoll *et al.*, 2007a; Fenoll *et al.*, 2007b).

Linearity: the linear intervals for all the OPs were located on the concentration rank of 0.01 and 1.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. The correlation coefficients (r)

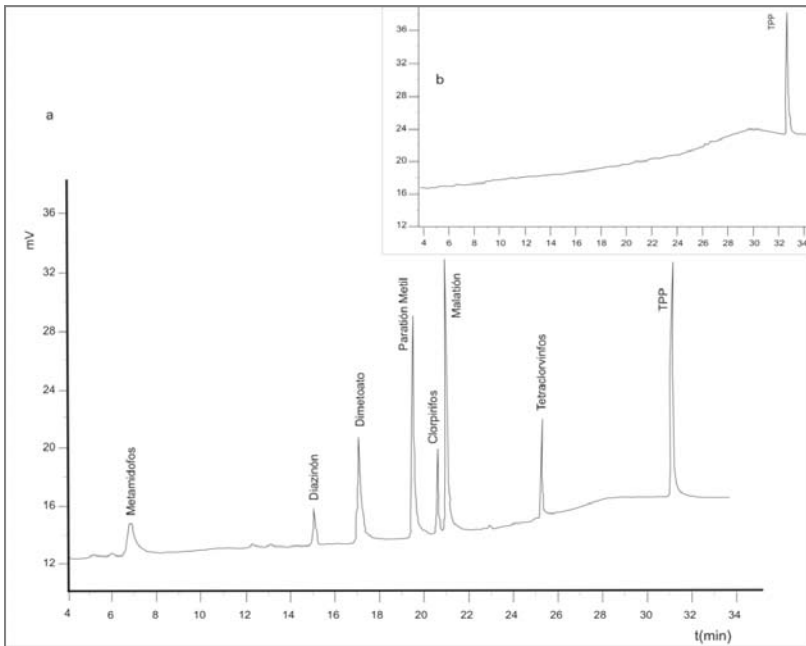


Figura 2. Cromatograma (NPD) obtenido de: (a) muestra fortificada, (b) extracto blanco de tomate.

Figure 2. Chromatogram (NPD) obtained from: (a) fortified sample, (b) blank extract of tomato.

tió separar adecuadamente y sin interferencias las señales de los OPs analizados y el estándar interno. El análisis por GC-NPD en extractos de muestras blanco de lechuga, tomate y pimentón, sin limpieza, confirmando la ausencia de interferencias por co-extratos, han sido reportados por otros autores (Fenoll *et al.*, 2007a; Fenoll *et al.*, 2007b).

Linealidad: los intervalos de linealidad para todos los OPs, se ubicaron en el rango de concentración de 0,01 y 1,0 mg.kg⁻¹. Los coeficientes de correlación (r) derivados de la regresión lineal fueron siempre adecuados (r>0.991). Los valores de los coeficien-

derived from the linear regression were always adequate (r>0.991). The values of the correlation coefficients were statistically analyzed, showing a significant correlation after comparing the t-values calculated with the tabular in the significance applied level (Miller and Miller, 2002).

Detection (LD) and quantification (LC) limits: were determined employing the linear regression proposed by Miller and Miller (2002) for LD: $Y - Y_B = 3S_B$ and for LC: $Y - Y_B = 10S_B$, in the 7 pesticides. In general, good results were obtained in all the matrixes, with limit detection values in the rank from 0.011 and 0.032

tes de correlación fueron estadísticamente analizados, demostrándose una correlación significativa luego de comparar los t-valores calculados con los tabulados en el nivel de significancia aplicado (Miller y Miller, 2002)

Límites de detección (LD) y cuantificación (LC): se determinaron empleando la regresión lineal propuesta por Miller y Miller (2002), para LD: $Y - Y_B = 3S_B$ y para LC: $Y - Y_B = 10S_B$, en los 7 plaguicidas. En general, buenos resultados fueron alcanzados en todas las matrices, con valores de límites de detección en el rango de 0,011 y 0,032 mg.kg⁻¹ y límites de cuantificación entre 0,036 y 0,104 mg.kg⁻¹. Estos resultados señalan que el GC-NPD permitió detectar niveles de cuantificación más bajos que los límites máximos de residuos establecidos (FAO/WHO, 2005), demostrando la conveniencia del método para análisis de rutina. Los valores de LD y LC logrados con el método propuesto son similares a los obtenidos anteriormente por otros autores en el análisis de vegetales (Berrada *et al.*, 2010; Darko y Akoto, 2008).

Exactitud y repetibilidad: la recuperación en las muestras de vegetales, a dos niveles de enriquecimiento (0,1 y 1,0 mg.kg⁻¹) estuvo en el rango de 72 y 110% (cuadro 2). La repetibilidad intra-diaria fue evaluada como DER y se ubicó entre 3 y 14%. La reproducibilidad inter-diaria fue menor de 18% en todos los casos. Estos resultados muestran una buena exactitud y precisión, indicando que las soluciones de acetato de etilo/acetona (90:10% v/v) como solvente de extracción, es aplicable para la deter-

mg.kg⁻¹ and quantification limits 0.036 and 0.104 mg.kg⁻¹. These results mention that GC-NPD permitted detecting lower quantification levels than the maximum residue limits established (FAO/WHO, 2005), proving the convenience of the method for the routine analysis. LD and LC values obtained with the method proposed are similar to those obtained by other author for the analysis of vegetables (Berrada *et al.*, 2010; Darko and Akoto, 2008).

Accuracy and repeatability, the recovery on the vegetables samples at two enrichment levels (0.1 and 1.0 mg.kg⁻¹) ranked from 72 to 110% (table 2). The inter-daily repeatability was evaluated as DER and located between 3 and 14%. The inter-daily repeatability was lower than 18% in all the cases. These results show accuracy, indicating that ethylacetate acetone solutions (90:10% v/v), as extraction solvents, are applicable for determining the studied OPs residues in the researches vegetables. Previous researches have proved similar results regarding the recovery and DER in fruits and vegetables (Darko and Akoto, 2008; Fenoll *et al.*, 2007b).

Analysis in field samples

The analytical methodology developed on this research was applied in the sample analysis on the field of different vegetables (potato, onion, tomato, pepper, lettuce and chive) cropped in Jose Maria Vargas parish, Tachira state, Republica Bolivariana de Venezuela (an agriculture area), during February-April 2008.

The results indicate that out of the 48 samples analyzed (8 per

Cuadro 2. Residuos de plaguicidas organofosforados en vegetales analizados con el método propuesto.
Table 2. Residues of organophosphorous pesticides in vegetables analyzed with the method proposed.

Vegetales (muestras analizadas)	Plaguicida	Muestras contaminadas (%)	Muestras que exceden el LMR	Rango de residuos (mg.kg ⁻¹)	LMR (mg.kg ⁻¹)
Papa (8)	Matamidofos	1 (12,5)	0	Tr-0,087	0,1
Tomate (8)	Metamidofos	3 (37,5)	2	Tr - 0.49	0,1
	Clorpirrifos	1 (12,5)	0	0.10	0,3
Pimentón (8)	Metamidofos	5 (62,5)	4	0.10 - 0.40	0,1
	Malatión	2 (25,0)	0	0.07 - 0.29	0,3
Lechuga (8)	Metamidofos	2 (25,0)	1	Tr - 0.07	0,1

Tr: Trazas

LMR: Límite máximo de residuos

minación de residuos de OPs estudiados en los vegetales investigados. Estudios previos han mostrado resultados semejantes en cuanto a recuperación y DER en frutas y vegetales (Darko y Akoto, 2008; Fenoll *et al.*, 2007b).

Análisis en muestras de campo

La metodología analítica desarrollada en esta investigación fue aplicada en el análisis de muestras de campo de diferentes vegetales (papa, cebolla, tomate, pimentón, lechuga y cebollín) cosechados en el municipio José María Vargas del estado Táchira en la República Bolivariana de Venezuela (zona netamente agrícola), durante el período Febrero-Abril 2008.

Los resultados indican que de las 48 muestras analizadas (8 por vegetal), 14 (29%) presentaron contaminación con alguno de los plaguicidas estudiados (cuadro 2). De las muestras contaminadas, el 50% excedían los límites máximos de residuos establecidos (FAO/WHO, 2005).

El pimentón presentó el mayor número de muestras contaminadas (88%), seguido de tomate (50%), lechuga (25%) y papa (12,5%). Así mismo, el pimentón aportó el mayor número de muestras que excedían el límite máximo de residuos (50%). Metamidofos estuvo presente en 4 de los 6 vegetales analizados. Cebolla y cebollín no presentaron contaminación con ninguno de los plaguicidas estudiados. Se estima que la mayor contaminación en pimentón y tomate es debida probablemente, al empleo inadecuado de plaguicidas en estas matrices agrícolas en la región específica de estudio. Los niveles de residuos de OPs reportados en vegetales cultivados en

vegetable), 14 (29%) presented contamination by some of the pesticides studied (table 2). From the studied samples, 50% exceeded the maximum limits of the established residues (FAO/WHO, 2005).

Pepper presented the highest number of polluted samples (88%), followed by the tomato (50%), lettuce (25%) and potato (12.5%). Likewise, the pepper provided the highest number of samples that exceeded the maximum limit of residues (50%). Methamidophos was present in 5 out of the 6 vegetables analyzed. The onion and chives did not present contamination with any of the pesticides studied. It is estimated that the highest contamination in pepper and tomato might be due to the inadequate employment of pesticides in these agriculture matrixes in the specific region. The residue levels of Ops reported in the vegetables cropped in Sao Paulo, Brazil, correspond to the ones obtained in the current research (Gebara *et al.*, 2005).

Conclusions

The simplified multiresidual method proposed for the determination of residues of organophosphorous pesticides in the vegetable samples analyzed, is sensitive, accurate, fast, and simple and does not require any clean-up. The analyses in real samples show the validity of the method used, which allowed the identification and quantification of the pesticides present in the samples. Finally, this multiresidual method constitutes an efficient and safe tool for the monitoring of pesticides residues in vegetables,

Sao Paulo, Brazil, se corresponden a los obtenidos en el presente estudio (Gebara *et al.*, 2005).

Conclusiones

El método multiresidual simplificado propuesto, para la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en las muestras de vegetales analizadas, es sensible, preciso, rápido, simple y no requiere limpieza. Los análisis en muestras reales evidencian la validez del método usado, que permitió la identificación y cuantificación de los plaguicidas presentes en las muestras. Finalmente, este método multiresidual constituye una herramienta eficiente y segura para el monitoreo de residuos de plaguicidas en vegetales, que puede permitir la inclusión de nuevos plaguicidas organofosforados empleados en esta región agrícola.

Literatura citada

Amvrazi, E.G. y N.G. Tsiropoulos. 2009. Application of single-drop microextraction coupled with gas chromatography for the determination of multiclass pesticides in vegetables with nitrogen phosphorus and electron capture detection. *Journal of Chromatography A*, 1216, 2789-2797.

Bai, Y., L. Zhou y J. Wang. 2006. Organophosphorus pesticide residues in market foods in Shaanxi area, China. *Food Chem.* 98: 240-242.

Berrada, H., M. Fernández, M.J. Ruíz, J.C. Molto, J. Mañes y G. Font. 2010. Surveillance of pesticide residues in fruits from Valencia during twenty months (2004/05). *Food Control.* 21: 36-44.

that allow the inclusion of new organophosphorous pesticides employed in this region.

End of english version

Darko, G. y O. Akoto. 2008. Dietary intake of organophosphorus pesticide residues through vegetables from Kumasi, Ghana. *Food Chem Toxicol.* 46: 3703-3706.

Ettiene, G., S. Ortega, J. Sepúlveda, D. Medina, y I. Buscema. 2006. Disipation of organophosphorus pesticides in green onion (*Allium fistulosum* L.), cultivated in forced system called "barbacoas". *Bull Environ Contam Toxicol.* 76: 415-421.

Ettiene, G., P. García, R. Bauza, D. Medina, y L. Sandoval. 2010. Validación de un método para la determinación de insecticidas organofosforados en hojas y tallos de guayabo (*Psidium guajava* L), usando extracción ultrasónica y limpieza en fase sólida. *Rev. Fac. Agron. (LUZ).* 25:550-569.

FAO/WHO. 2005. Codex alimentarius. Recommended methods of sampling for the determination of pesticide residues for compliance with MRLs, vol 2A.

Fenoll, J., P. Hellín, J. López, A. González y P. Flores. 2007a. Simplified multiresidue method for determination of pesticide residues in lettuce by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Anal Bioanal Chem.* 389: 643-651.

Fenoll, J., P. Hellín, C.M. Martínez, M. Miguel, y P. Flores. 2007b. Multiresidue method for análisis of pesticides in pepper and tomato by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Food Chem.* 105:711-719.

Fytianos, K., G. Drimaropoulou, N. Raikos, G. Theodoridis y H. Tsoukali. 2007. Headspace Solid-Phase Microextraction for the Gas

- Chromatographic Analysis of Organophosphorus Insecticides in Vegetables. *J AOAC Int.* 90: 1677-1681.
- Gebara, A., C. Ciscato, M. Ferreira y Monteiro, S. 2005. Pesticide residues in vegetables and fruits monitored in São Paulo City, Brazil, 1994-2001. *Bull Environ Contam Toxicol.* 75:163-169.
- Kruve, A., A. Künnapas, K. Herodes y I. Leito. 2008. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1187: 58-66.
- Mezcua, M., C. Ferrer, J.F. García, M.J. Martínez, M. Sigrist y A.R. Fernández. 2009. Analyses of selected non-authorized insecticides in peppers by gas chromatography/mass spectrometry and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 112(1): 221-225.
- Miller, J.N. y J.C. Miller. 2002. Estadística y quimiometría para química analítica. Cuarta edición. Pearson Educación, S. A. Madrid, España, pp 115-118.
- Pihlström, T., G. Blomkvist, P. Friman, U. Pagard y B. Österdahl. 2007. Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Anal Bioanal Chem.* 389: 1773-1789.
- Prieto, A., D. Molero, G. González, I. Buscema, G. Ettiene, y D. Medina. 2002. Persistence of methamidophos, diazinon, and malathion in tomatoes. *Bull Environ Contam Toxicol.* 69: 479-485.
- Quintero, A., M. Caselles, G. Ettiene, N.G. de Colmenares, T. Ramírez y D. Medina. 2008. Monitoring of organophosphorus pesticide residues in vegetables of agricultural area in Venezuela. *Bull Environ Contam Toxicol.* 81: 393-396.
- Radišić, M., S. Grujić, T. Vasiljević y M. Laušević. 2009. Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 113(2): 712-719.
- Ravelo, L.M., J. Hernández y M.A. Rodríguez. 2008. Multi-walled carbon nanotubes as efficient solid-phase extraction materials of organophosphorus pesticides from apple, grape, orange and pineapple fruit juices. *J Chromatogr A.* 1211: 33-42.
- Sharma, D., A. Nagpal y Y.B. Pakade. 2010. Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: A review. *Talanta.* 82(4):1077-1089.
- Sobhanzadeh, E., N.K. Abu, K. Nemati y M.R. Abas. 2009. Sample preparation methods for pesticides analysis in food matrices and environmental samples by chromatography-based techniques: A review. *World Appl Sci J.* 7(8): 923-950.