

Desarrollo y validación de un método ambientalmente amigable para la determinación de carbofurano en suelos

Development and validation of an environmentally friendly method for the determination of carbofuran in soil

Desenvolvimento e validação de um método ambientalmente amigável para a determinação de carbofurano em solos

Amanda Lucía Chaparro-García,¹ Alfonso Quijano-Parra,² Raúl Rodríguez-Martínez³
Luis Francisco Lizarazo-Gutiérrez⁴

¹ PhD, University of Massachusetts. Docente-investigadora, Departamento de Química, Universidad de Pamplona. Pamplona, Colombia. achaparro@unipamplona.edu.co

² PhD, Universidad Estatal M. V. Lomonósov de Moscú. Docente-investigador, Departamento de Química, Universidad de Pamplona. Pamplona, Colombia. alfonsoquijanoparra@unipamplona.edu.co

³ PhD, Universidad de Salamanca. Docente-investigador, Departamento de Bacteriología, Universidad de Pamplona. Pamplona, Colombia. rrodriguez@unipamplona.edu.co

⁴ Químico, Universidad de Pamplona. Independiente. Pamplona, Colombia. lfizarazo.quimica@gmail.com.

Fecha de recepción: 12/03/2015

Fecha de aceptación: 11/06/2016

Para citar este artículo: Chaparro-García AL, Quijano-Parra A, Rodríguez-Martínez R, Lizarazo-Gutiérrez LF. 2017. Desarrollo y validación de un método ambientalmente amigable para la determinación de carbofurano en suelos. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria*. 18(1):89-102

DOI: http://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol18_num1_art:560

Resumen

En este trabajo se desarrolló y validó un método analítico ambientalmente amigable para la extracción y cuantificación del N-metilcarbamato carbofurano, en muestras de suelos cultivados con papa criolla. La técnica usada para la extracción fue dispersión de matriz en fase sólida (MSPD). La cuantificación de los residuos de carbofurano se llevó a cabo por cromatografía de gases con detector de microcaptura de electrones (μ -ECD), con el método del estándar externo. Este método fue comparado con la técnica de extracción Soxhlet para muestras contaminadas con Furadan[®] 3SC. Se evaluaron diferentes parámetros que afectan el proceso de extracción MSPD, como la fase estacionaria, el solvente y el volumen de elución

en muestras de suelos dopadas con Furadan[®] 3SC, con una concentración final de 50 mg/kg de ingrediente activo (carbofurano); se tuvo como variable de respuesta el porcentaje de recuperación. Se encontró que las mejores condiciones de extracción de carbofurano para estas matrices se dieron con 0,2 g de muestra macerados con 0,8 g de sílica gel como adsorbente en una relación 1:4 muestra/adsorbente. Las muestras fueron extraídas en un cartucho con 5 ml de hexano-acetona en relación 8:2 como solvente de elución. La metodología propuesta permitió determinar niveles de trazas de carbofurano en muestras de suelo con porcentajes de recuperación del 96,58 %.

Palabras clave: extracción en dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), cromatografía de gases (GC/ μ -ECD), carbofurano

Abstract

In this study, an environmentally friendly analytical method was developed and validated for the extraction and quantification of N-methylcarbamate carbofuran in soil samples taken from orchards cultivated with a local potato variety. The extraction was carried out with a Matrix solid-phase Dispersion (MSPD) technique. Gas chromatography with micro electron capture detector (μ -ECD) was used for the quantification of carbofuran residues in the samples, using the external standard method. Results obtained from this method were then compared with the Soxhlet technique used for samples contaminated with the commercial product Furadan[®] 3SC. Different

parameters affecting the MSPD extraction process were evaluated, such as the stationary phase, the solvent and elution volume in soil samples treated with Furadan[®] 3SC to a final concentration of 50 mg/kg¹ of active ingredient (carbofuran). The recovery rate was used as a response variable. The best carbofuran extraction conditions for these matrices were obtained with 0.2 g of macerated sample with 0.8 g of silica gel as adsorbent in a 1:4 sample/adsorbent ratio. Samples were extracted on a cartridge with 5 ml of hexane-acetone at a 8:2 ratio as an elution solvent. The proposed method allowed to determine trace levels of carbofuran in soil samples with recovery rates of 96.58 %.

Keywords: Matrix solid phase dispersion (MSPD), gas chromatography (GC/ μ -ECD), carbofuran

Resumo

Em este trabalho desenvolveu-se e validou um método analítico ambientalmente amigável para a extração e quantificação do N-metilcarbamato carbofurano, em amostras de solos cultivados com batata crioula. A técnica usada para a extração foi dispersão de matriz em fase sólida (MSPD). A quantificação dos resíduos de carbofurano levou-se a cabo por cromatografia de gases com detector de microcaptura de elétrons (μ -ECD), com o método do padrão externo. Este método foi comparado com a técnica de extração Soxhlet para amostras contaminadas com Furadam[®] 3SC. Avaliaram-se diferentes parâmetros que afetam o processo de extração MSPD, como a fase estacionária, o solvente

e o volume de eluição em amostras de solos dopadas com Furadam[®] 3SC, com uma concentração final de 50 mg/kg de ingrediente ativo (carbofurano); teve-se como variável de resposta a percentagem de recuperação. Encontrou-se que as melhores condições de extração de carbofurano para estas matrizes deram-se com 0,2 g de amostra macerados com 0,8 g de sílica gel como adsorvente em uma relação 1:4 amostra/adsorvente. As amostras foram extraídas em um cartucho com 5 ml de hexano-acetona em relação 8:2 como solvente de eluição. A metodologia proposta permitiu determinar níveis de resíduos de carbofurano em amostras de solo com percentagens de recuperação do 96,58 %.

Palavras chave: extração em dispersão de matriz em fase sólida (MSPD), cromatografia de gases (GC/ μ -ECD), carbofurano

Introducción

El uso de pesticidas ha ayudado a mantener y aumentar la producción de alimentos en todo el mundo, pero, a su vez, ha sido una de las causas de la contaminación del suelo por su efecto nocivo para el ecosistema y la salud humana. Además, la falta de control en el desarrollo de las actividades agrícolas ha traído como consecuencia la acumulación de sustancias tóxicas (compuestos organoclorados, organofosforados, carbamatos, nitroaromáticos y metales pesados) en suelos, agua y cultivos. Estos últimos pueden ser la vía de entrada de estas sustancias a la cadena alimenticia y, en consecuencia, generar un riesgo para la salud humana (Valencia et al. 2010).

El carbofurano es un insecticida sistémico de amplio espectro, con actividad nematocida, que actúa por contacto e ingestión. Tiene un peso molecular de 221,3 g/mol y una solubilidad en agua de 700 mg/L. Su toxicología es grado I, es decir, es altamente tóxico, y presenta persistencia en suelo y en agua debido a su alta solubilidad (Richards 2011). Se usa para el control de insectos de una gran variedad de cultivos, especialmente, para arroz, frutas, girasol, hortalizas, maíz, papa, soja y trigo (Alexander 1991).

Este plaguicida inhibe la enzima colinesterasa, se absorbe por la piel, por ingestión y por inhalación. No se acumula en el organismo, pero como su biotransformación es muy lenta, provoca efectos acumulativos en las personas expuestas y llega a tener potencial carcinogénico, razón por la cual ha sido ampliamente estudiado en diferentes matrices como agua, suelo, aire y alimentos (EPA 1992; Barr et al. 2002; Sánchez-Brunete et al. 2003; Sun y Lee 2003; Granby et al. 2004; Atrache et al. 2005; Lambropoulou y Albanis 2005; Basheer et al. 2009).

En Colombia, el carbofurano se utiliza para controlar plagas en diversos cultivos, entre los cuales se encuentran el café, la caña de azúcar, los cereales, las frutas, las hortalizas y los tubérculos como la papa. En el cultivo de papa se emplea usualmente en su presentación granular como Furadan® 3GR, con un contenido de ingrediente activo de 3%. El uso de este producto se ha convertido en una necesidad básica en el cultivo de la papa, situación

que ha llevado a los agricultores, no solo a una permanente aplicación, sino a modificar su forma de hacer de manera progresiva, especialmente, en lo relacionado con la dosis y el número de aplicaciones.

Para el 2012, en Colombia, la papa ocupó un área sembrada de 133.865 hectáreas, con una producción total de 2.788.050 toneladas y un rendimiento promedio de 20,83 t/ha (Mosquera y Cuéllar 2013). De dicha área sembrada solamente un 6% estuvo dedicado a la papa criolla. Los productores de papa de Norte de Santander manejan un promedio de 10-14 aplicaciones de plaguicidas por ciclo de cultivo. Esto lo hacen a partir de los ocho días de haber emergido la papa; después, la aplicación se realiza cada ocho o quince días dependiendo del clima. En algunas ocasiones, los agricultores, en busca de mayor eficacia en la acción del plaguicida, aplican dosis excesivas, que superan hasta cinco veces las dosis recomendadas por el fabricante, lo cual genera problemas mayores para el ambiente.

Debido a estos problemas ambientales, las nuevas legislaciones promulgadas en EE. UU. y en otros países les exigen a las agencias reguladoras establecer las tolerancias para las cantidades máximas de pesticidas en los alimentos. Estos valores son determinados por cada país y, a veces, ocasionan conflictos, dado que los niveles de residuo aceptables en un país podrían ser inaceptables en otro. Los valores difieren entre países, porque las proporciones requeridas de aplicación pueden variar según las condiciones agrícolas y climáticas de las diferentes regiones de cada país (Coupe 2000; Zawiya et al. 2007). Para establecer los niveles de residuos de pesticida presentes en los alimentos, es probable que los laboratorios alrededor del mundo realicen más de 200.000 análisis por año (Kuster et al. 2009).

Tradicionalmente los métodos de extracción que son utilizados para determinar residuos de pesticidas son extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida, extracción con agitación de barras absorbentes, microextracción en fase sólida, extracción con Soxhlet (López-Mesas y Crespi 2000). Las principales limitaciones de estas técnicas radican en el uso de grandes cantidades de disolvente, el tiempo largo de extracción y la generación de desechos tóxicos,

entre otras. Además, los constituyentes de la matriz pueden ser coextraídos y posteriormente coeluidos con los componentes analizados y, por lo tanto, interferir con la identificación y cuantificación de los analitos. Para evitar estos inconvenientes, en los últimos años se han desarrollado diferentes técnicas verdes de extracción para pesticidas como ultrasonido, extracción asistida por microondas, extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME) y dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) (Barker 2007).

La MSPD es un proceso para la extracción y limpieza de muestras sólidas y semisólidas desarrollado por Barker y colaboradores en 1989 (Barker 2000). El método implica la dispersión de la muestra en un adsorbente sólido, seguido de purificación preliminar y elución de los analitos con un pequeño volumen de solvente (Kristenson et al. 2006; Capriotti et al. 2010). Este adsorbente sirve como compuesto abrasivo para romper la estructura física de la muestra, adsorbe los compuestos de la matriz, funciona como un soporte sólido para el llenado de la columna y permite el fraccionamiento de la muestra (Rial-Otero et al. 2007). Esta técnica requiere menos tiempo de extracción y menor consumo de solvente; proporciona resultados similares a SPE o Soxhlet y ha demostrado ser útil en muestras complejas (Capriotti et al. 2013; Dos Reis Souza 2013; Cao et al. 2015; Cao et al. 2016; Zhang et al. 2016).

El propósito de esta investigación fue implementar un método alternativo para la extracción de carbofurano en suelos: por dispersión en matriz en fase sólida (MSPD), cuantificación por cromatografía de gases y acople a un detector de microcaptura de electrones GC/ μ -ECD. El método es amigable con el medioambiente, genera menos desechos, es más económico y presenta un menor consumo de tiempo y energía.

Metodología

Reactivos

Para el presente estudio se empleó el estándar analítico de carbofurano 98 % (Dr. Ehrenstorfer), acetona y

hexano grado de pureza HPLC (Merck[®]), sulfato de sodio anhidro (Merck[®]), carbón activado (Sigma[®]), sílica gel (Merck[®]), alúmina (Sigma[®]) y Furadan[®] 3SC, cuyo ingrediente activo es carbofurano (FMC Corporation).

Equipos

Las extracciones y los análisis cromatográficos se llevaron a cabo mediante un equipo de SPE (Supelco VisiprepTM), baño de ultrasonido (Branson 1510), equipo Soxhlet (Heidolph) y un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890.

Estandarización del método de extracción

Con el fin de establecer las condiciones favorables para la extracción por MSPD, se evaluó la influencia de los siguientes parámetros: tipo de fase estacionaria, tipo de solvente y volumen de este. Todos los análisis realizados se llevaron a cabo por duplicado. La determinación de las mejores condiciones para el proceso de extracción se llevó a cabo con 0,2 g de muestra de suelo sin fumigar, adquirida en la finca La María, vereda de San Agustín, del municipio de Mutiscua, en el departamento de Norte de Santander.

Para la comparación de las técnicas de extracción, se utilizaron muestras de suelos de la misma finca cultivados con papa criolla y fumigados con Furadan[®] 3SC. Las muestras de suelo se secaron y se tamizaron por malla no. 10 (2 mm). Posteriormente, estas fueron dopadas con 5 μ l de solución 50 mg/L de carbofurano, maceradas y homogenizadas con 0,8 g de la fase estacionaria seca (sílica, alúmina o carbón activado). Esta mezcla se transfirió a una jeringa desechable de 5 ml, que contenía en su interior una capa de lana de vidrio con sulfato de sodio anhidro seco (hasta 1 ml). Finalmente, se colocó una nueva capa de lana de vidrio, se compactó y se eluyó con 5 ml del disolvente (acetona, hexano y hexano-acetona) en un equipo de SPE (máx. 20" Hg), y se concentró a 1 ml en un rotaevaporador a 40 °C. Enseguida, se procedió a inyectar 2 μ l de esta solución en el

cromatógrafo para la determinación y cuantificación de carbofurano.

Determinación de las condiciones cromatográficas

Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890 equipado con un puerto de inyección *split-splitless*, con un detector de microcaptura de electrones (μ -ECD) y con una columna capilar no polar (Restek) RTX-5 (5 % fenil y 95 % dimetilpolisiloxano) de 30 mm x 0,32 mm de diámetro interno x 0,5 μ m de espesor. El gas portador empleado fue helio (99,995 %, Aga-Fano) a un flujo de 2 ml/min y la temperatura del detector (μ -ECD) se estableció en 320 °C. Se evaluaron diferentes rampas de calentamiento para determinar las condiciones adecuadas para la detección del carbofurano. Una vez ajustadas, se procedió a aumentar la velocidad de calentamiento para la reducción del tiempo de análisis. El tiempo de retención del carbofurano fue determinado con solución estándar de 50 mg/L.

Validación del método de extracción

Una vez seleccionadas las condiciones favorables para la extracción del carbofurano en suelo, se procedió a calcular la precisión del método de extracción, mediante la determinación de la exactitud, la precisión y la reproducibilidad. Para ello, se prepararon muestras sintéticas de suelo dopadas con estándar de carbofurano a una concentración conocida.

Para la determinación de los anteriores parámetros se preparó, a partir del estándar de carbofurano, una solución madre de 1.000 mg/L en acetona grado cromatográfico, la cual se empleó para preparar soluciones patrón de 5, 10, 25, 50, 75 y 100 mg/L. Para todos los análisis fueron inyectados en el cromatógrafo 2 μ l de solución.

Exactitud. La evaluación de la exactitud del método se basó en la recuperación de cantidades conocidas de carbofurano en muestras con tres concentraciones

diferentes (5, 10 y 20 mg/L), las cuales fueron analizadas por duplicado de acuerdo con las condiciones adecuadas.

Precisión. La precisión del método fue evaluada durante un día y los valores de repetitividad fueron calculados con el análisis de muestras ($n = 4$) a una concentración de 5 mg/L.

Reproducibilidad. En este estudio se inyectaron, por duplicado, tres soluciones de 5, 10 y 20 mg/L. Las inyecciones se realizaron durante dos días, a la misma hora y por diferente analista (Quattrocchi et al. 1992).

Linealidad, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

Se determinaron los límites de detección y cuantificación. Los límites de detección y cuantificación LOD (proporción señal a ruido de 3; S/N = 3) y LOQ (proporción señal a ruido de 10; S/N = 10).

Extracción y determinación de carbofurano por Soxhlet

Se usó como referencia el método utilizado por Sandra Babić et al. (1998). Para este procedimiento se tomaron 10 g de muestra de suelo contaminado con pesticida. Esta cantidad fue transferida a un balón de fondo redondo y se le agregaron 250 ml de acetato etilo, todo lo cual fue puesto a reflujo en un equipo Soxhlet durante 24 horas. La fracción de solvente se filtró sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a 5 ml en un rotaevaporador a 40 °C. Enseguida, se procedió a inyectar 2 μ l de esta solución en el cromatógrafo para la determinación y cuantificación de carbofurano.

El método desarrollado en esta investigación, luego de ser validado, se comparó con el método tradicional por Soxhlet, mediante el análisis de una muestra expuesta a la contaminación con pesticida tomada de la misma finca, pero de un área que había sido fumigada cinco días antes. Todos los análisis se hicieron por duplicado.

Análisis estadísticos

Con los datos de los diferentes análisis cromatográficos de los parámetros evaluados, se realizaron las respectivas integraciones del pico de carbofurano (5,03 min), y con las áreas se calcularon las concentraciones como se puede observar en la figura 1. Se determinaron las desviaciones estándar, los coeficientes de variación y los intervalos de confianza, según el caso, con el *software* OriginPro (versión de prueba).

Resultados

En esta investigación se presenta un método alternativo para la extracción de carbofurano por MSPD, seguido de la cuantificación por cromatografía de gases con detector de captura de electrones. Este método reduce considerablemente el tiempo de análisis y el consumo de solventes, en comparación

con metodologías convencionales. Adicionalmente, se reduce la generación de desechos y el consumo de energía, lo cual lo convierte en un método amigable con el medioambiente y la salud.

Determinación de las condiciones cromatográficas

Para los análisis cromatográficos, la temperatura del inyector se mantuvo en 250 °C y la del detector en 320 °C. De las diferentes rampas de calentamiento evaluadas, la que mostró mejores resultados fue la que se inició a 120 °C y se mantuvo a esta temperatura por dos minutos; a continuación, se aumentó a razón de 30 °C/min hasta 200 °C. De ahí, se aumentó a razón de 8 °C/min hasta 260 °C; por último, se aumentó a razón de 30 °C/min hasta alcanzar una temperatura final de 295 °C.

La curva de calibración obtenida con estas condiciones se muestra en la figura 2, en la cual se puede observar un excelente coeficiente de correlación.

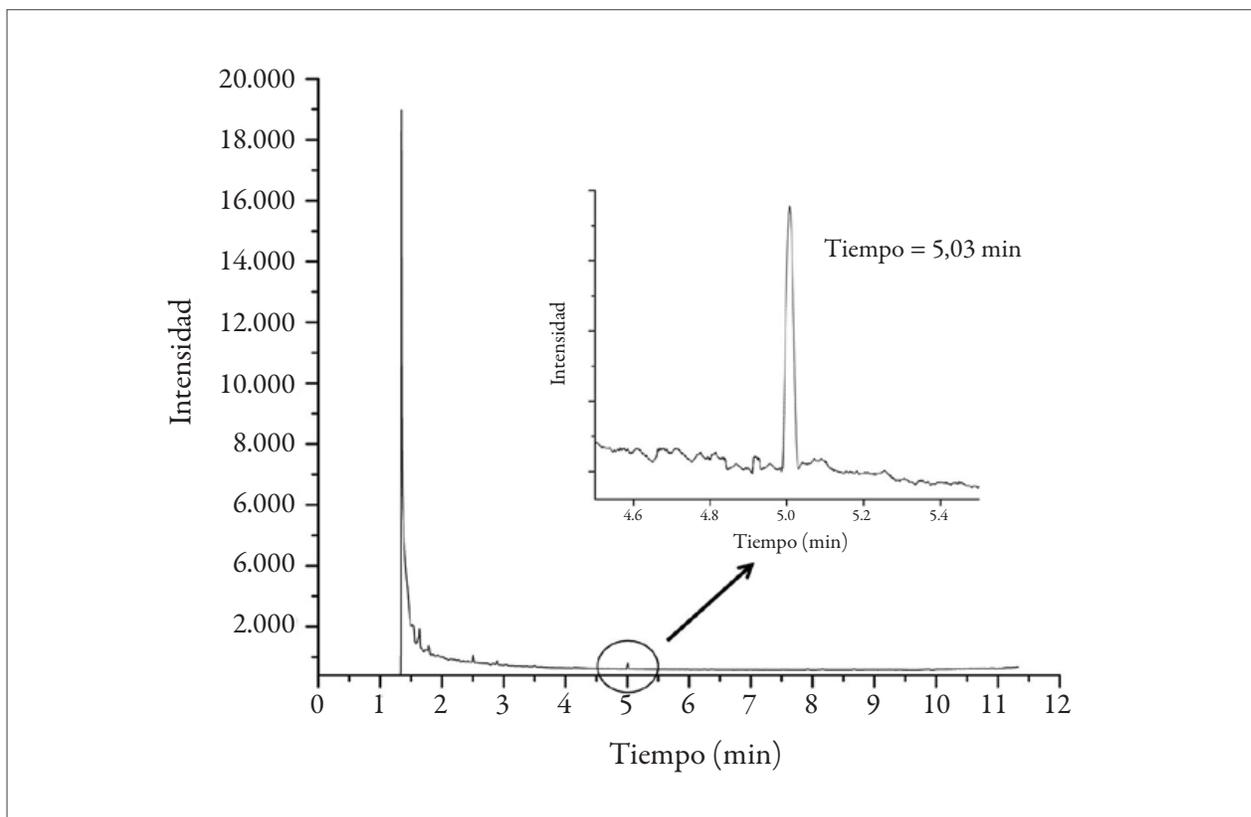


Figura 1. Cromatograma de una solución de 10 mg/L de carbofurano.

Fuente: Elaboración propia

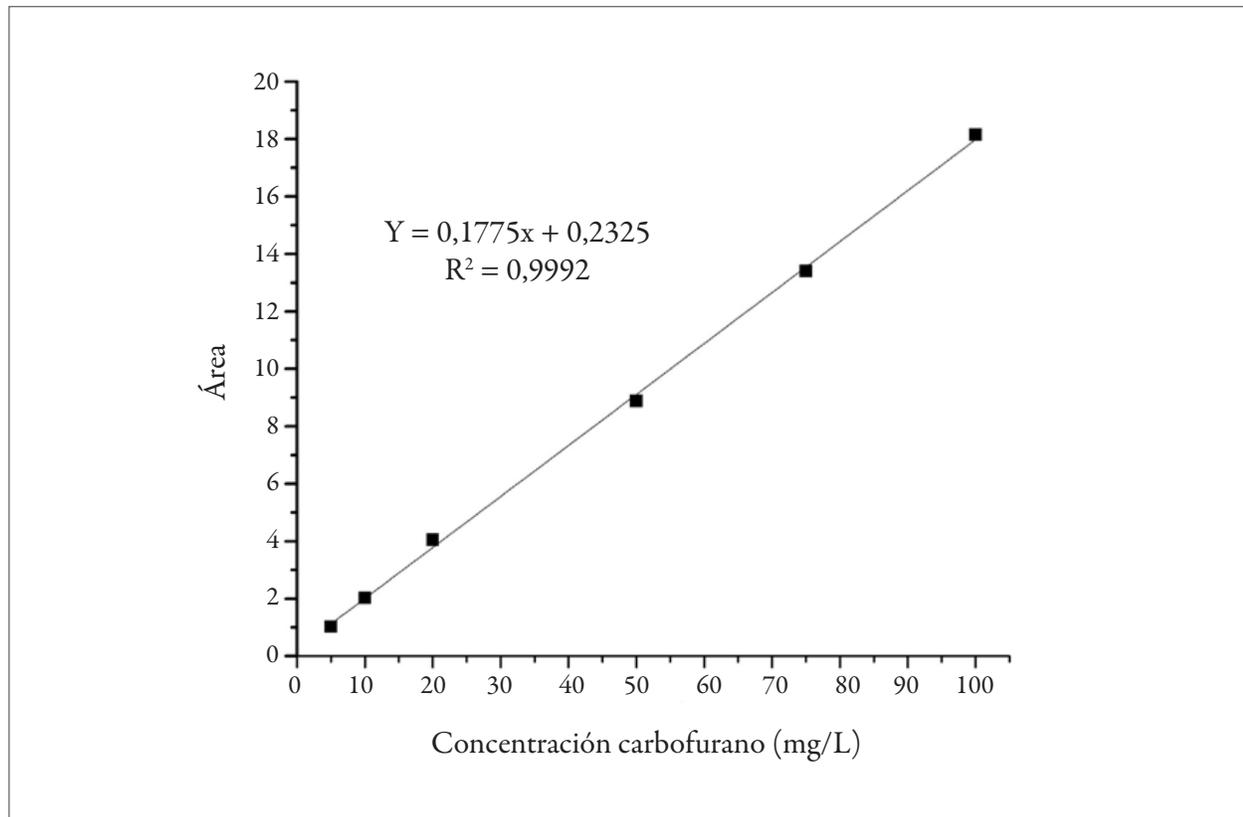


Figura 2. Curva de calibración del carbofurano.

Fuente: Elaboración propia

El tiempo de análisis cromatográfico fue de 11,33 min y el carbofurano se observó en un tiempo de retención de 5,03 min, como se puede observar en la figura 1. Estos resultados muestran una reducción del tiempo de corrida en un 62,2 % al compararlo con los trabajos realizados por Santos Delgado y colaboradores (2001), quienes utilizaron un GC-FID HP-5090 y un detector NPD con una columna HP-5 (30 m x 0,53 mm x 2,65 mm), con un tiempo de análisis de 30 min y un tiempo de retención del carbofurano de 22 min.

Por su parte, el método utilizado por Silva et al. (2008) empleaba 28 min para la determinación de 8 pesticidas; el carbofurano se encontró en un tiempo de retención de 15,56 min. Ellos emplearon un sistema de Shimadzu (Kioto, Japón), que consistía en un espectrómetro de masas QP-5050A, equipado con un cromatógrafo de gases GC-17A y con un inyector *split/splitless*. También utilizaron una

columna de sílice fundida DB-5MS (5 % fenil-95 % polidimetilsiloxano; 30m, 0,25 mm ID, 0,25 μ m), suministrada por J&W Scientific (Folsom, CA, EE. UU.), y helio (pureza 99,999 %) como gas portador a una velocidad de flujo de 1,8 ml/min. Tras comparar dicho método con el desarrollado en este trabajo se observa una reducción en el tiempo de corrida de 59,54 % (Silva et al. 2008).

Determinación de las condiciones favorables para la extracción de carbofurano por MSPD

En los experimentos realizados para esta extracción se evaluaron diferentes parámetros que afectan este proceso, como tipo de solvente, fase estacionaria y volumen de solvente. Los porcentajes de recuperación en los extractos fueron calculados comparando el área del pico de carbofurano con los de las soluciones de concentración conocida utilizadas en la curva de calibración.

Selección de la fase estacionaria, solvente y volumen de solvente

Todas las superficies de los materiales tienen una química definible y muchas sustancias, incluyendo una variedad de minerales. La identificación de su composición puede servir para mejorar el aislamiento de compuestos o clases de compuestos específicos, que pueden incluso mezclarse para lograr los resultados deseados. Hasta la fecha, se ha reportado el uso de los materiales a base de sílices (sílica gel, derivados de sílice, arena, Florisil®) de manera casi exclusiva para MSPD.

En este trabajo se evaluaron tres fases estacionarias con dos solventes individuales y sus mezclas. Como se puede observar en las figuras 3, 4 y 5, para los diferentes solventes evaluados (5 ml de hexano, 5 ml de acetona y 5 ml de hexano-acetona, respectivamente), la fase estacionaria que dio mejores resultados de extracción fue la de sílica gel, seguida de la de alúmina y, por último, la de carbón activado, que presentó menor eficiencia de extracción. El solvente que mejor porcentaje de recuperación presentó fue la mezcla de hexano-acetona.

La naturaleza de la matriz influye en gran medida en la eficiencia de la MSPD, dado que los coeficientes de distribución de analitos se determinan, en parte, por la interacción analitos/matriz. Es así que el debilitamiento de esta interacción puede aumentar significativamente los coeficientes de distribución.

Las polaridades de la fase estacionaria y el solvente de elución son factores clave en la MSPD, puesto que determinan tanto la eficacia de la extracción como la pureza de los extractos finales (Poole 2007). La elección de estos parámetros depende de la polaridad del analito y de las interferencias que podrían coextraer con la matriz de la muestra. La alúmina y la sílica son polares, por tanto, el carbofurano, que es de moderada polaridad, es eluido en mayor cantidad y a mayor velocidad. Los materiales derivados de la sílica son los más empleados en la disrupción de la matriz en la MSPD, debido a que presentan la ventaja de poseer grupos silanoles no enlazados (tanto en la superficie de las partículas como en los poros) que interactúan con el agua de la muestra y actúan, a su vez, como agente desecante. El carbón activado elimina muchas interferencias propias de la matriz, pero, a su vez, adsorbe el carbofurano, por lo cual la recuperación es menor.

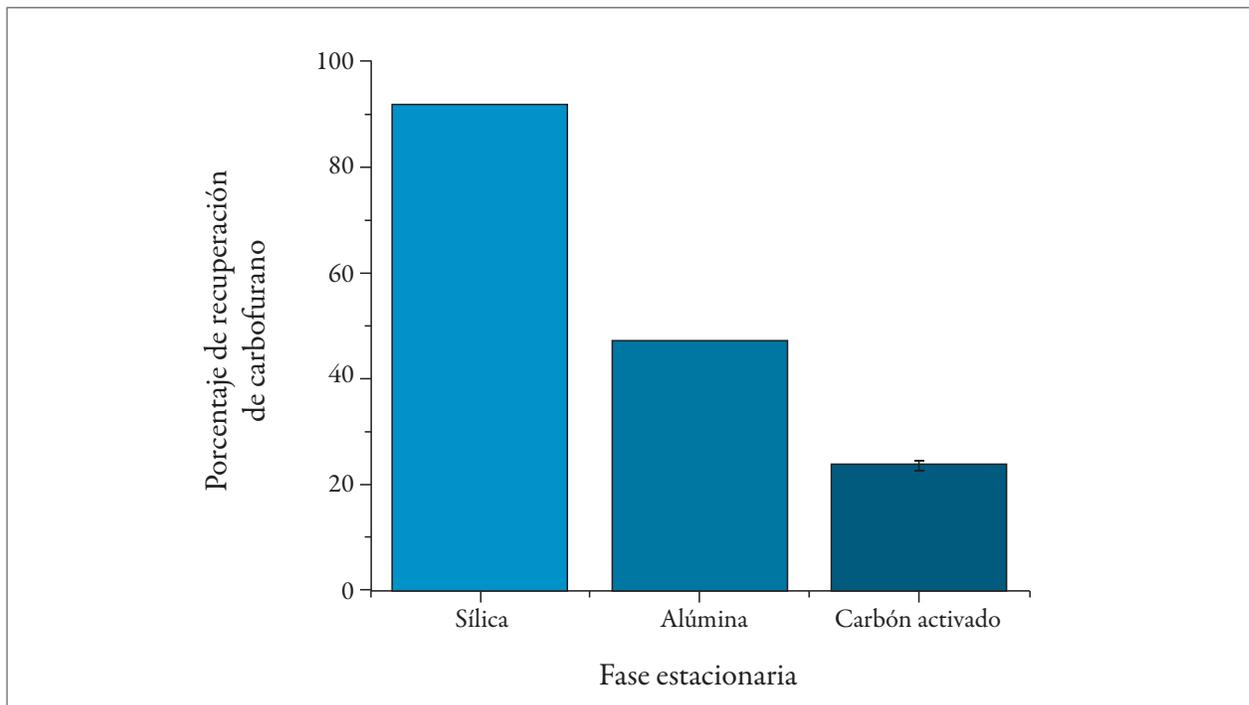


Figura 3. Cantidad de carbofurano extraído con 5 ml de hexano para cada fase estacionaria.

Fuente: Elaboración propia

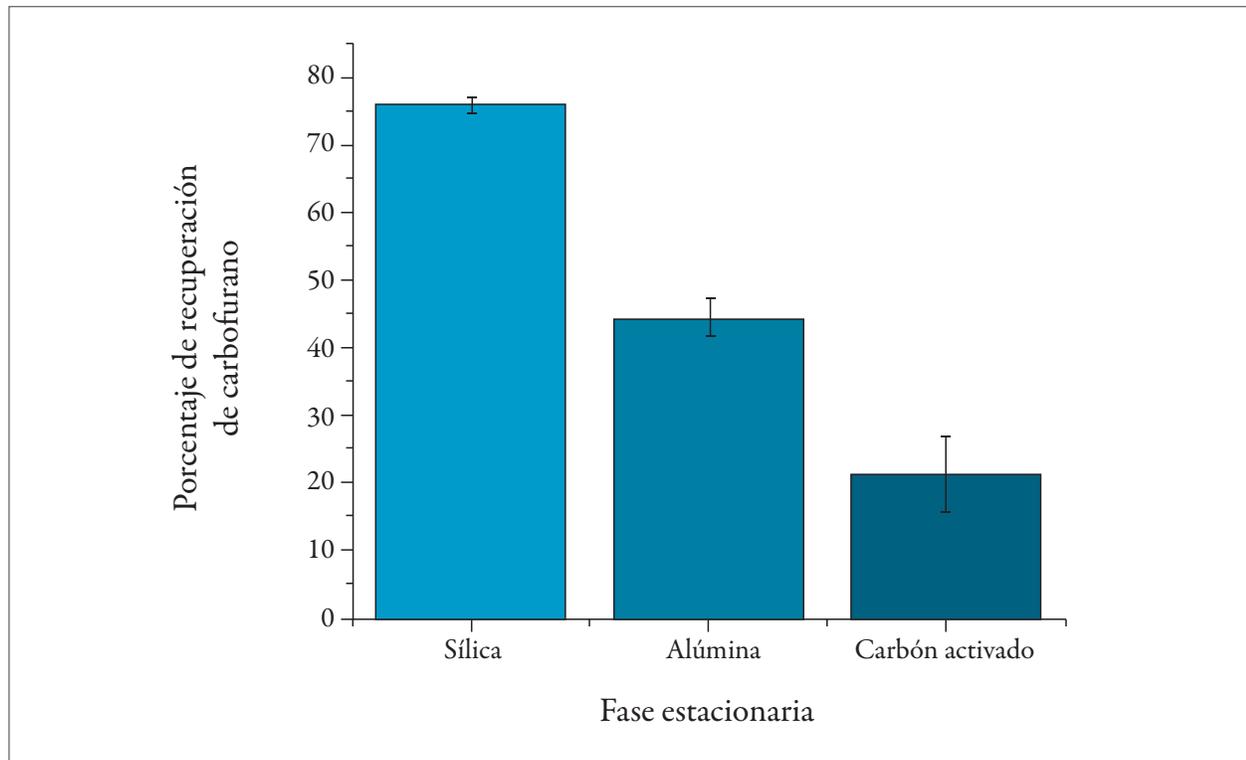


Figura 4. Cantidad de carbofurano extraído con 5 ml de acetona para cada fase estacionaria.

Fuente: Elaboración propia

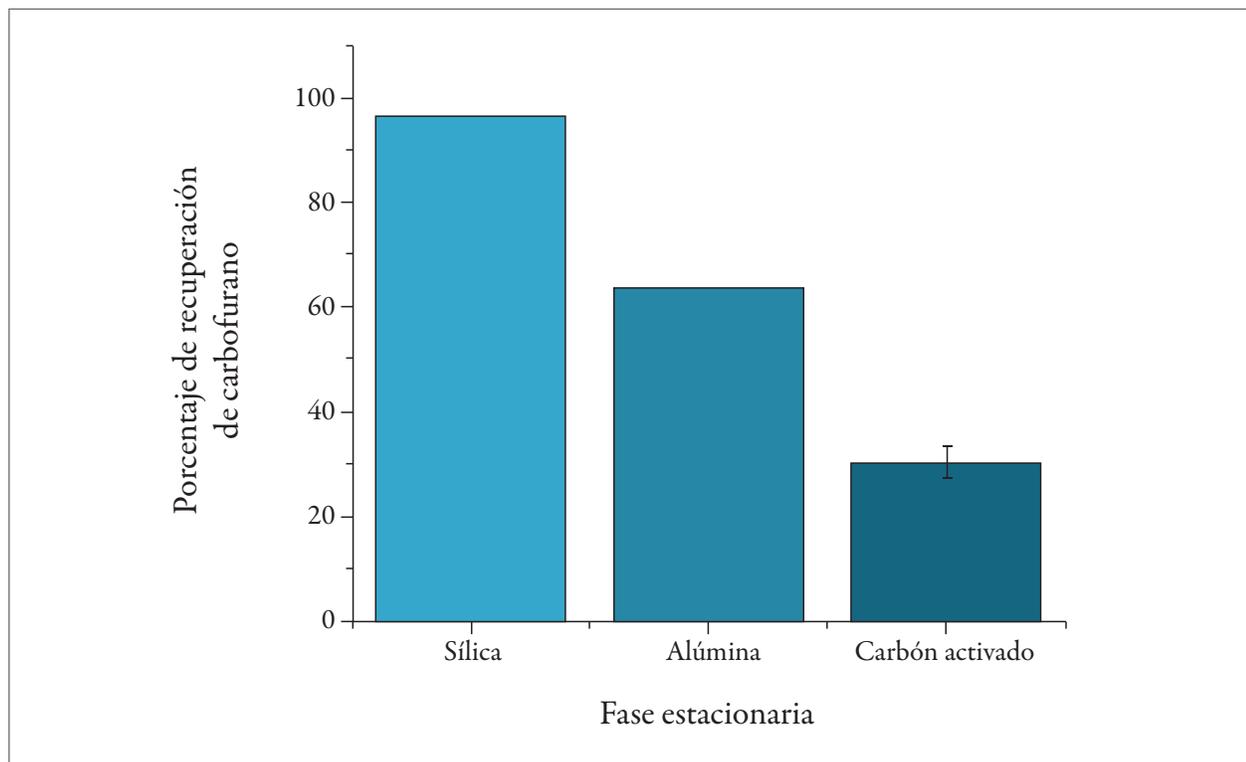


Figura 5. Cantidad de carbofurano extraído con 5 ml de hexano-acetona para cada fase estacionaria.

Fuente: Elaboración propia

Una vez definida la fase estacionaria y el solvente, se procedió a evaluar diferentes volúmenes de este con el ánimo de disminuirlo. Como se puede observar en la figura 6, con la utilización de hexano-acetona, la diferencia entre los volúmenes de 2 ml, 3 ml y 5 ml es equivalente: se encuentra dentro de la desviación. Se decidió utilizar 5 ml para los demás análisis, puesto que tal cantidad es la que presenta un mayor porcentaje de recuperación y una menor desviación estándar. Posteriormente, este volumen se concentró a un 1 ml para su análisis cromatográfico.

Debido a la importancia de cuantificar carbofurano y otros pesticidas en alimentos, diferentes investigadores han desarrollado procedimientos para este fin. Es así como, Bogialli et al. (2004) desarrollaron un método simple, rápido y específico para el análisis de siete insecticidas de carbamatos ampliamente utilizados en frutas y verduras: después de la maceración de la matriz con arena de cristobalita, los analitos fueron extraídos con agua caliente (50-100 °C). A 50 °C, las recuperaciones fueron del 76 % al 99 % (Bogialli et al. 2004).

Por su parte, Silva et al. (2008) desarrollaron un procedimiento para determinar carbofurano, 3-hidroxicarbofurano, lufenurón, triclofon, tiabendazol, difenoconazol, malatión y dimetoato en la pulpa de coco, mediante MSPD seguido por GC/MS. Los mejores resultados fueron obtenidos utilizando 0,5 g de la pulpa de coco, 1,0 g de C18 como dispersante, 1,0 g de Florisil® para limpieza y 40 ml de acetonitrilo saturado con n-hexano como disolvente de elución. El extracto fue concentrado a 1 ml en un rotaevaporador y 1 µl de este fue inyectado en el cromatógrafo. El método fue validado mediante la utilización de muestras de pulpa de coco dopadas con pesticidas en los diferentes niveles de concentración (0,25-1,0 mg/kg). Con estas condiciones obtuvieron un porcentaje de recuperación del 79,9% para el carbofurano, con una desviación estándar de 9,7, un coeficiente de correlación de 0,9976 y un LOQ de 0,15 mg/kg (Silva et al. 2008).

Ferreira et al. (2013) desarrollaron un método basado en la dispersión de matriz de fase sólida, junto con cromatografía líquida con detector UV, para la

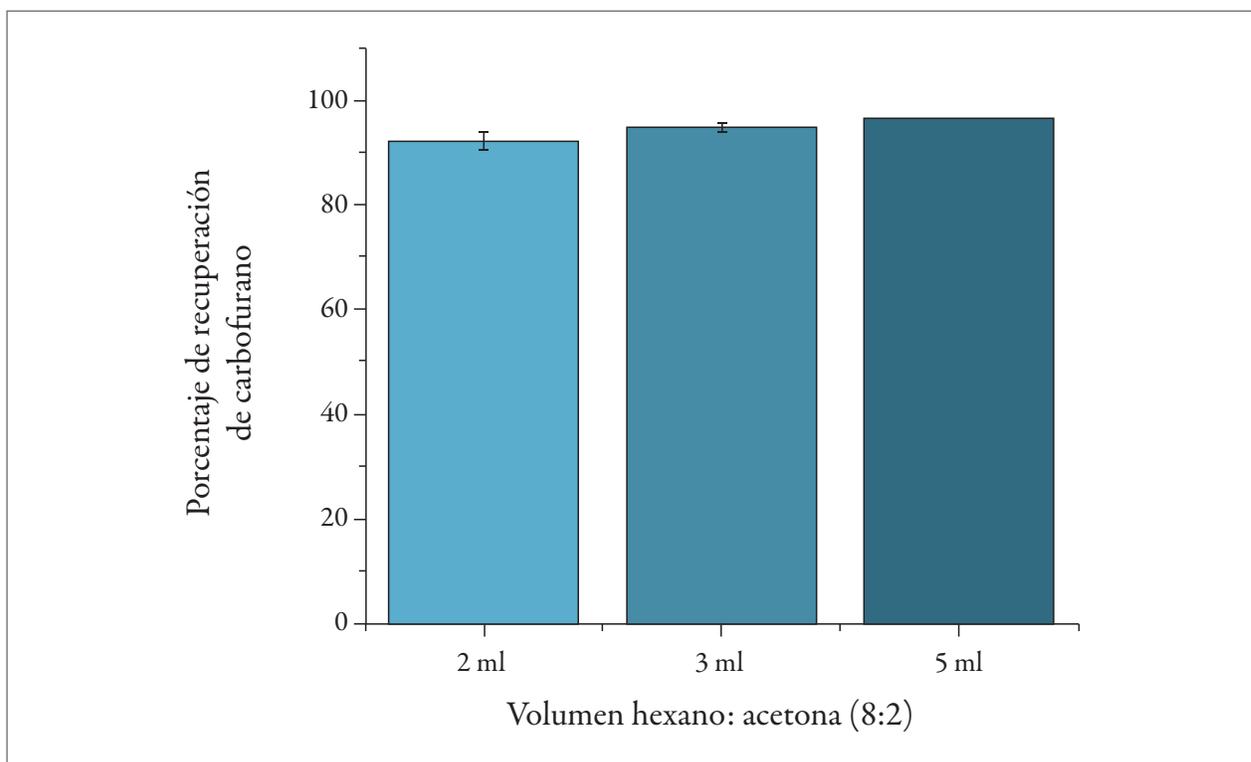


Figura 6. Cantidad de carbofurano extraído con diferentes volúmenes de hexano-acetona.

Fuente: Elaboración propia

determinación de carbofurano, difenoconazol, b-ciflutrina, espiroclorfenol y metil-tiofanato en el tallo de la palma de coco. Los mejores resultados los obtuvieron usando 2,0 g de tallo, 1,6 g de Florisil® como dispersante y 20 ml de ciclohexano:acetona (4:1). El método fue validado con la utilización de muestras madre enriquecidas con pesticidas en cuatro niveles de concentración (0,05-2,0 µg/g). Las recuperaciones promedio variaron de 70 % a 114,3 %, con desviaciones estándar relativas entre 1,2 % y 19,2 %. Los límites de detección y cuantificación los encontraron en los rangos de 0,02-0,03 y 0,05-0,10 µg/g, respectivamente. Para el caso específico del carbofurano, el porcentaje de recuperación con sílica gel fue del 77 %, pero para los otros pesticidas evaluados en estas condiciones fue inferior; con Florisil®, fue del 74 %, y con alúmina, del 68 %, con un tiempo de retención de 24,3 min.

En estudios realizados por Łozowicka et al. (2014), fue evaluado un método de análisis basado en dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) junto con cromatografía de gases, para determinar la presencia de 163 pesticidas (6 acaricidas, 62 fungicidas, 18 herbicidas y 77 insecticidas) en varias plantas. Este método fue optimizado teniendo en cuenta diferentes parámetros (relación muestra-sorbente, solvente de extracción, sorbentes para la etapa de limpieza, etc.). De las condiciones evaluadas, las que presentaron mejor resultado fueron las de 2 g de muestra, 4 g de Florisil® y 25 ml de solvente acetona-metanol (9:1). Con estas condiciones, obtuvieron recuperaciones de 70 a 119 % para la mayoría de los pesticidas. Para el caso específico del carbofurano, el coeficiente de correlación fue de 0,998, con un LOQ de 0,020 mg/kg y con porcentajes de recuperación para las cuatro plantas evaluadas de 77±6 % - 95±10 % (Łozowicka et al. 2014).

Por otra parte, Qin-Bao et al. (2010) propusieron un método por MSPD seguido por GC-MS-MS, para determinar el carbofurano y otros pesticidas en maíz, patata y col. Este método utilizó alúmina neutra como sorbente de extracción con una relación 1:4 de muestra-sorbente y 8 ml de acetona como solvente de elución. Con estas condiciones, el porcentaje de recuperación de carbofurano fue de

97 % con alúmina y del 85 % con Florisil®. El LOQ fue de 0,005 mg/kg y el coeficiente de correlación, de 0,998, para un tiempo de retención de 14,38 min (Qin-Bao et al. 2010).

Como puede observarse, en estas investigaciones el consumo de solventes y dispersantes fue mayor que el encontrado en el presente estudio, y se obtuvieron porcentajes de recuperación similares a los reportados en este trabajo.

Validación del método MSPD para la extracción y cuantificación de carbofurano en suelos

Las condiciones más favorables para la extracción y determinación de carbofurano en suelos por MSPD-GC (µ-ECD) se dieron con 0,2 g de muestra de suelo con maceración y homogenización de 0,8 g de sílica gel. Esta muestra se transfiere a una jeringa desechable de 5 ml que contiene en su interior una capa de lana de vidrio, una de sulfato de sodio, una de la mezcla de la muestra con la fase y una nueva capa de lana de vidrio, todo lo cual es compactado. Luego de esto, la mezcla se eluye con 5 ml de hexano-acetona (8:2) en un equipo de SPE (máx. 20" Hg) y se concentra hasta 1 ml. Enseguida, se procede a inyectar 2 µl de esta solución en el cromatógrafo para la determinación y cuantificación de la carbofurano.

Este método fue validado para el análisis de carbofurano en muestras de suelo, a partir de la evaluación de la linealidad, el límite de detección, el límite de cuantificación, la precisión y la exactitud. Los resultados de validación son presentados en la tabla 1.

Se puede establecer que la metodología propuesta es lineal en el rango de concentración entre 10 y 100 mg/kg, ya que existe una correlación significativa entre la concentración del analito y la respuesta brindada por el equipo, con un coeficiente de correlación de 0,996; lo cual muestra una buena linealidad en el rango de concentraciones examinadas. Cada análisis se realizó por duplicado. Además, se estableció (con una confiabilidad del 95 %) que existe regresión significativa y que no hay desvío de la linealidad.

Tabla 1. Resultados de validación para el método MSPD-CG/ μ -ECD

Parámetros	Valor
Ecuación	$Y = 0,1756x - 0,0879$
Rango lineal (mg/kg)	5-100
n	5
m	0,1756
b	0,0876
R ²	0,9964
LOD (mg/kg)	2,84
LOQ (mg/kg)	7,86
% recuperación (exactitud)	96,58
RSD (precisión)	0,996
n	5

Fuente: Elaboración propia

Según el porcentaje de recuperación de carbofurano y la desviación estándar relativa (RSD) obtenidos (tabla 1), estos procedimientos son considerados adecuados para el análisis de residuos del pesticida, porque muestran que la reproducibilidad del método es satisfactoria, por consiguiente, puede ser usado para el análisis de residuos de carbofurano en muestras de suelo.

Comparación de las técnicas de extracción

A partir de la metodología desarrollada, se procesó una muestra de suelo contaminada que había sido fumigada con quince días de antelación, tomada en la vereda San Agustín, ubicada en Mutiscua (Norte de Santander). En ella se determinó la presencia de carbofurano por MSPD-GC/ μ -ECD y se comparó con el método tradicional (Soxhlet).

Los resultados obtenidos para Soxhlet frente MSPD son presentados en la tabla 2. El método Soxhlet proporcionó valores de carbofurano (mg/kg)

análogos a MSPD, pero esta última es una técnica más sencilla y menos costosa. Como se observa en la tabla 2, hay una reducción cercana al 98 % en el consumo de tiempo y de solvente, lo que implica una reducción en el consumo de energía, costo de análisis y generación de desechos. Con la técnica de MSPD se pueden extraer varias muestras simultáneamente, contrario a la del Soxhlet, en la cual solo se puede tratar una muestra a la vez. Esto también representa una ventaja de la MSPD.

En el método por MSPD se ha integrado la etapa de limpieza con el proceso extracción, lo cual minimiza la manipulación de los extractos y evita la pérdida de analito. Frente al MSPD, el Soxhlet requiere un mayor consumo de disolvente, por lo cual este último no es una técnica recomendada a pesar de ser convencional: la gran cantidad de solvente usado proporciona una alta contaminación no solo al ambiente, sino al operador; además de requerir una mayor cantidad de muestra.

Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran que la técnica de dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) es una metodología validada, específica, selectiva, robusta y suficientemente sensible a límites críticos inferiores a las cantidades de plaguicida normalmente aplicadas por los agricultores de la región. La exactitud, precisión y linealidad del método propuesto cumplen con las metas analíticas para la determinación de carbofurano en suelos. El perfil cromatográfico muestra la selectividad de la técnica y demuestra la importancia de seleccionar un sorbente y disolvente de elución adecuados, a fin de minimizar las interferencias de la matriz.

Este método requiere una pequeña cantidad de la muestra y ofrece un ahorro considerable en términos de consumo de solventes, costo de los reactivos, gasto de energía, manipulación de la muestra y tiempo de análisis, con resultados equivalentes o mejores que los del método Soxhlet. Adicional-

mente, la MSPD es amigable con el medioambiente y evita el uso excesivo de solventes orgánicos, que implican un riesgo tanto para el ambiente como para el analista.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de Pamplona por la financiación de este trabajo, producto del proyecto de la convocatoria interna de la Vicerrectoría de Investigaciones titulado “Biorremediación de suelos de cultivo de papa criolla (*Solanum phureja*) contaminados con pesticidas en la provincia de Pamplona - Norte de Santander”; y al Laboratorio de Control de Calidad por su apoyo en la ejecución de este trabajo.

Descargos de responsabilidad

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Alexander M. 1991. Introduction to soil microbiology. 2nd ed. New York, EE. UU.: John Wiley & Sons Canada.
- Atrache LL, Sabbah S, Morizur JP. 2005. Identification of Phenyl-N-methylcarbamates and their transformation products in Tunisian surface water by solid-phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*. 65(2):603-612.
- Babić S, Petrović M, Kaštelan-Macan M. 1998. Ultrasonic solvent extraction of pesticides from soil. *J Chromatogr A*. 823(1-2):3-9.
- Barker SA. 2000. Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *J Chromatogr A*. 880(1-2):63-68.
- Barker SA. 2007. Matrix solid phase dispersion (MSPD). *J Biochem Bioph Meth*. 70(2):151-162.
- Barr DB, Barr JR, Maggio VL, Whitehead RD, Sadowski MA, Whyatt RM, Needham LL. 2002. A multi-analyte method for the quantification of contemporary pesticides in human serum and plasma using high-resolution mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 778(1-2):99-111.
- Basheer C, Alnedhary AA, Rao BS, Lee HK. 2009. Determination of carbamate pesticides using micro-solid-phase extraction combined with high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 1216(2):211-216.
- Bogialli S, Curini R, Corcia AD, Nazzari M, Tamburro D. 2004. A simple and rapid assay for analyzing residues of carbamate insecticides in vegetables and fruits: hot water extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 52(4):665-671.
- Cao W, Hu SS, Ye LH, Cao J, Pang XQ, Xu JJ. 2016. Trace matrix solid phase dispersion using a molecular sieve as the sorbent for the determination of flavonoids in fruit peels by ultra-performance liquid chromatography. *Food Chem*. 190:474-480.
- Cao Y, Tang H, Chen D, Li L. 2015. A novel method based on MSPD for simultaneous determination of 16 pesticide residues in tea by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 998-999:72-79.
- Capriotti AL, Cavaliere C, Giansanti P, Gubbiotti R, Samperi R, Laganà A. 2010. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *J Chromatogr A*. 1217(16): 2521-2532.
- Capriotti AL, Cavaliere C, Laganà A, Piovesana S, Samperi R. 2013. Recent trends in matrix solid-phase dispersion. *Trends Anal Chem*. 43:53-66.
- Coupe RH, Manning MA, Foreman WT, Goolsby DA, Majewski MS. 2000. Occurrence of pesticides in rain and air in urban and agricultural areas of Mississippi, April-September 1995. *Sci Total Envir*. 248(2-3):227-240.

- Dos Reis Souza M, Oliveira Moreira C, Gleice de Lima T, Aquino A, Silveira Dórea H. 2013. Validation of a matrix solid phase dispersion (MSPD) technique for determination of pesticides in lyophilized eggs of the chicken *Gallus gallus domesticus*. *Microchem J*. 110:395-401.
- [EPA] United States Environmental Protection Agency. 1992. Another look: national survey of pesticides in drinking water wells, phase 2 report. EPA 570/9-91-020; [consultado 2015 abr]. <https://nepis.epa.gov>.
- Ferreira JA, Santana-Santos LF, Souza NR, Navickiene S, de Oliveira FA, Talamini V. 2013. MSPD sample preparation approach for reversed-phase liquid chromatographic analysis of pesticide residues in stem of coconut palm. *Bull Environ Contam Toxicol*. 91(2):160-164.
- Granby K, Andersen JH, Christensen HB. 2004. Analysis of pesticides in fruit, vegetables and cereals using methanolic extraction and detection by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 520:165-176.
- Kristenson EM, Ramos L, Brinkman UAT. 2006. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trends Anal Chem*. 25(2):96-111.
- Kuster M, López de Alda M, Barceló D. 2009. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis and regulatory issues of polar pesticides in natural and treated waters. *J Chromatogr A*. 1216(3):520-529.
- Lambropoulou DA, Albanis TA. 2005. Application of hollow fiber liquid phase microextraction for the determination of insecticides in water. *J Chromatogr A*. 1072(1):55-61.
- López-Mesas M, Crespi M. 2000. Revisión de los métodos de extracción y purificación de pesticidas de muestras con alto contenido de materia grasa. *Grasas Aceites*. 51(3):183-189.
- Łozowicka B, Jankowska M, Rutkowska E, Hrynko I, Kaczyński P, Miciński J. 2014. The evaluation of a fast and simple pesticide multiresidue method in various herbs by gas chromatography. *J Nat Med*. 68(1):95-111.
- Mosquera T, Cuéllar D. 2013. La gota en la producción de la papa. En: *La genética de la papa frente a la gota*. Bogotá, Colombia: Editorial UN.
- Poole CF. 2007. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *J Chromatogr A*. 1158(1-2):241-250.
- Qin-Bao L, Hui-Juan S, Ping X. 2010. MSPD-GC-MS-MS determination of residues of 15 organic nitrogen-containing pesticides in vegetables. *Chromatographia*. 72(11):1143-1148.
- Quattrocchi OA, Abelaira de Andrizzi SI, Laba RF. 1992. *Introducción a la HPLC: aplicación y práctica*. Buenos Aires, Argentina: Artes Gráficas S. A. Capítulo 12. Validación de métodos.
- Rial-Otero R, Gaspar EM, Moura I, Capelo JL. 2007. Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: an overview. *Talanta*. 71(2):503-514.
- Richards N, editor. 2011. *Carbofuran and wildlife poisoning: global perspectives and forensic approaches*. New York, EE. UU.: John Wiley & Sons.
- Sánchez-Brunete C, Rodríguez A, Tadeo JL. 2003. Multiresidue analysis of carbamate pesticides in soil by sonication-assisted extraction in small columns and liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 1007(1-2):85-91.
- Santos Delgado MJ, Rubio Barroso S, Fernández-Tostado GT, Polo-Díez LM. 2001. Stability studies of carbamate pesticides and analysis by gas chromatography with flame ionization and nitrogen-phosphorus detection. *J Chromatogr A*. 921(2):287-296.
- Silva MG, Aquino A, Dórea HS, Navickiene S. 2008. Simultaneous determination of eight pesticide residues in coconut using MSPD and GC/MS. *Talanta*. 76(3):680-684.
- Sun L, Lee HK. 2003. Optimization of microwave-assisted extraction and supercritical fluid extraction of carbamate pesticides in soil by experimental design methodology. *J Chromatogr A*. 1014(1-2):165-177.
- Valencia YA, Potosí SF, Valencia EM, Bravo I. 2010. Validación de una metodología para la determinación de carbofuran en suelos mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con detección ultravioleta (Clar-UV). *Rev Colomb Quim*. 39(3):359-370.
- Zawiyah S, Che Man YB, Nazimah SAH, Chin CK, Tsukamoto I, Hamanyza AH, Norhaizan I. 2007. Determination of organochlorine and pyrethroid pesticides in fruit and vegetables using SAX/PSA clean-up column. *Food Chem*. 102(1):98-103.
- Zhang Q, Zhu W, Guan H, Liu H, Yang W, Wang H, Cai D. 2016. Development of a matrix solid-phase dispersion extraction combined with high-performance liquid chromatography for determination of five lignans from the *Schisandra chinensis*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 1011:151-157.