

Artículo original

Extracción de plaguicidas en el aguacate Hass (*Persea americana* Mill. cv.) mediante el uso de C₁₈ y arcillas funcionales como fase adsorbente en la metodología QuEChERS

Extraction of pesticides in Hass avocado (*Persea americana* Mill. cv.) using C₁₈ and functional clays as adsorbent phases in the QuEChERS methodology

✉ Juan Pablo Betancourt-Arango*, ✉ Cesar Augusto Ossa-Jaramillo,
✉ Gonzalo Taborda-Ocampo

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia

Resumen

La agenda interna de competitividad del departamento de Caldas incluye el aguacate Hass como uno de los productos hortofrutícolas de mayor importancia y proyección en la región. Dadas las condiciones favorables del trópico y la gran biodiversidad de plagas, es necesario el uso de plaguicidas para su control, lo que conlleva un potencial peligro para la salud de los consumidores por los residuos de estos químicos tóxicos en el producto final. El interés del presente estudio es la inocuidad alimentaria del aguacate Hass, para lo cual es necesario implementar y validar metodologías de análisis de plaguicidas organoclorados y organofosforados. Se hicieron análisis en las cáscaras y la pulpa de aguacates Hass con la metodología QuEChERS comparando el uso de dos fases adsorbentes, el C₁₈ y las arcillas funcionales, con el fin de obtener una mezcla de analitos que luego fueron separados e identificados por cromatografía de gases con un detector de microcaptura de electrones (GC - μ ECD) para los compuestos organoclorados, y por cromatografía de gases con detección de nitrógeno y fósforo (GC - NPD) para los compuestos organofosforados. La metodología QuEChERS asociada con arcillas funcionales resultó más eficiente que la extracción con fase C₁₈ según los valores de resolución promedio de 3,44 en cáscara y de 2,12 en pulpa. El uso de esta nueva fase adsorbente facilitó la separación, generó una mayor resolución y extrajo de una mejor manera los plaguicidas presentes en la matriz.

Palabras clave: Aguacate; Arcillas funcionales; Cromatografía de gases; QuEChERS; Plaguicidas.

Abstract

The competitiveness agenda of the department of Caldas, Colombia, defines Hass avocado as one of the most important and promising fruit and vegetable products in the region. Given the favorable conditions of the tropics for pests, the use of pesticides is necessary for their control leading to potential danger for consumers' health due to the residues of these toxic chemicals in the final product. Our study focused on the safety of Hass avocado for consumption implementing and validating methodologies for the analysis of organochlorinated and organophosphate pesticides. We analyzed shells and pulp using the QuEChERS methodology and compared two adsorbent phases, C₁₈ and functional clays, to obtain a mixture of analytes later separated and identified by gas chromatography with electron microcapture detector (GC - ECD) for organochlorine compounds and by gas chromatography with nitrogen and phosphorus detection (GC - NPD) for organophosphorus compounds. QuEChERS' methodology associated with functional clays was more efficient than C₁₈ phase extraction according to the average resolution values obtained: 3.44 for shells and 2.12 for pulp. The use of this new adsorbent phase also facilitated separation, generated a higher resolution, and extracted the pesticides present in the matrix more efficiently.

Keywords: Avocado; Functional clays; Gas chromatography; QuEChERS; Pesticides.

Citación: Betancourt-Arango JP, Ossa-Jaramillo CA, Taborda-Ocampo G. Extracción de plaguicidas en el aguacate Hass (*Persea americana* Mill. cv.) mediante el uso de C₁₈ y arcillas funcionales como fase adsorbente en la metodología QuEChERS. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 45(174):286-299, enero-marzo de 2021. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1235>

Editor: Sonia Moreno

***Correspondencia:**

Juan Pablo Betancourt-Arango;
chemquantum@outlook.com

Recibido: 8 de junio de 2020

Aceptado: 19 de diciembre de 2020

Publicado: 29 de marzo de 2021



Este artículo está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional

Introducción

Desde hace mucho tiempo los cultivos han sido protegidos para garantizar su conservación durante el transporte y la manipulación (**Karam, et al.**, 2004) mediante plaguicidas para el control de las diferentes plagas que pueden afectar los cultivos (**Cossio, et al.**, 2008). Estos plaguicidas se clasifican según las plagas que ayudan a combatir como insecticidas, fungicidas, herbicidas y raticidas, y según la familia química, como naturales o sintéticos (**Ferrer**, 2003). El cultivo de aguacate no es ajeno al efecto de las plagas, por lo que los agricultores se han visto en la necesidad de aplicar diferentes plaguicidas para preservar sus cosechas.

El aguacate es originario de México y América Central (**Cowan & Wolstenholme**, 2016). En términos botánicos y taxonómicos el aguacate Hass se conoce con el nombre científico de *Persea americana* Mill (**Serpa, et al.**, 2014). La demanda de este tipo de aguacate a nivel mundial ha crecido en los últimos años, lo que ha sido positivo para la economía de Colombia (**Cruz, et al.**, 2019). El departamento de Caldas, por ejemplo, pasó de producir 36.741 toneladas en el 2014 a 59.870 toneladas en el 2018 (**Cruz, et al.**, 2019). En ese contexto surgió la necesidad de controles rigurosos de la cantidad de residuos de plaguicidas en el producto dadas las exigencias de los mercados internacionales en cuanto a los niveles permitidos (**Tovar**, 2003). En este sentido, dado su alto contenido graso, el aguacate constituye un reto a la hora de su análisis por el posible efecto matriz (**Benavides & Echeverri**, 2014).

La extracción en fase sólida se ha consolidado como un método eficiente en la recuperación de plaguicidas en diferentes matrices analíticas. Entre las metodologías empleadas se destaca el método QuEChERS por ser rápido, fácil, barato, efectivo, sólido y seguro, por lo que se ha convertido en el más ampliamente utilizado para la extracción de los residuos de plaguicidas; en matrices como el aguacate, con un alto contenido graso, exige fases sólidas como la C_{18} para una extracción óptima (**Anastassiades, et al.**, 2003).

La metodología QuEChERS se caracteriza por ser un sistema de extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) en dos etapas: en la primera se hace una extracción simple con un disolvente orgánico en presencia de sales como el sulfato de magnesio (el cual facilita la recuperación del analito) o el cloruro de sodio (que ayuda a controlar la polaridad entre el contenido de agua y el solvente orgánico añadido), y en la segunda etapa se hace un proceso de limpieza mediante la extracción en fase sólida dispersiva para facilitar la eliminación de agua residual y de los diferentes tipos de compuestos que pueden estar presentes en la matriz de análisis (**López, et al.**, 2010; **Benavides & Echeverri**, 2014). En esta segunda etapa se utilizan sales y sorbentes como el sulfato de magnesio (que elimina el exceso de agua residual), o las aminas primarias o secundarias (PSA) (que retienen los diferentes ácidos orgánicos y grasos, los azúcares y otros pigmentos presentes en la muestra), y el C_{18} como fase adsorbente (el cual ayuda a la eliminación de grasas, esteroides y otro tipo de interferencias no polares presentes en la matriz) (**López, et al.**, 2010). Así, la selección de las sales para el análisis de plaguicidas con QuEChERS en una determinada matriz depende del tipo de método de análisis escogido (**López, et al.**, 2010; **Fenik, et al.**, 2011).

La importancia de este tipo de análisis radica en la constante vigilancia de los residuos de plaguicidas en las matrices biológicas para dar cumplimiento a la normativa de seguridad alimentaria que rige a nivel mundial (**Mandal, et al.**, 2020). Por ello es importante establecer metodologías de análisis residual que permitan determinar simultáneamente un gran número de plaguicidas. Hasta ahora se han utilizado diferentes procedimientos de extracción para separar eficientemente los diferentes analitos (**Melo, et al.**, 2020).

Esta metodología ha sido validada para un gran número de muestras de frutas y vegetales con resultados favorables en el análisis rutinario de plaguicidas en los laboratorios (**Páez & Martínez**, 2015). Se ha propuesto una alternativa del método para minimizar la cantidad de reactivos empleados durante el procedimiento que consiste en cambiar el C_{18} como fase adsorbente por el uso de arcillas del tipo de la montmorillonita (MMT), materiales laminares denominados filosilicatos que hacen parte de la familia de las esmectitas que

estructuralmente están conformadas por silicio y oxígeno principalmente (Obando, *et al.*, 2016). Asimismo, estas arcillas poseen cationes metálicos en su interlamina octaédrica que compensan la carga parcialmente negativa de los grupos silicato, por lo que pueden ser intercambiados por otros, generando así procesos de intercambio iónico que facilitan la extracción de diferentes tipos de analitos (Obando, *et al.*, 2016). En este estudio se hicieron ensayos previos de extracción de plaguicidas organoclorados y organofosforados en el aguacate Hass (*Persea americana* Mill. cv.) con la metodología QuEChERS utilizando la cromatografía de gases con detección de microcaptura de electrones (GC - μ ECD) para el análisis de plaguicidas organoclorados y la cromatografía de gases con detección de nitrógeno y fósforo (GC - NPD) para el análisis de compuestos organofosforados.

Metodología

Muestras

Las muestras de aguacate Hass se obtuvieron de diferentes fuentes comerciales para hacer los ensayos previos con la metodología QuEChERS modificada.

Extracción en fase sólida. Para la extracción de los plaguicidas se utilizó la técnica de extracción en fase sólida dispersiva también conocida como método QuEChERS (Anastassiades, *et al.*, 2003), en sus dos etapas: la extracción de los plaguicidas y la limpieza. En dicho proceso la fase estacionaria convencional es el C₁₈, pero en este caso se quiso comparar esta fase sólida con una fase a base de arcillas funcionales, por lo que se trabajó con una versión modificada de la metodología AOAC 2007.1 (Association of Official Analytical Chemists-AOAC, 2007) adaptada a las condiciones del laboratorio y al tipo de muestra según se describe en la información suplementaria.

Condiciones cromatográficas

Cromatografía de gases con detector de microcaptura de electrones (GC - μ ECD): se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard (HP 6890 Serie II) equipado con un detector de microcaptura de electrones. La columna usada fue de HP-5 (5 % fenilmetilsilicona), de 30 m \times 0,25 mm ID \times 0,25 μ m; la rampa de temperatura del horno fue la siguiente: una temperatura inicial de 150 °C durante un minuto y aumento a una velocidad de 5 °C/min hasta llegar a los 300 °C/5 min de calentamiento en la temperatura final y un tiempo de ejecución de 36 minutos. La temperatura del inyector fue de 250 °C en modo de inyección sin división (*splitless*) y un volumen de inyección de 1 μ L. El gas de arrastre fue el nitrógeno (99,999 % de pureza), la temperatura del detector fue de 290 °C y el flujo de columna, de 1,0 mL/min.

Cromatografía de gases con detector de nitrógeno y fósforo (GC - NPD): se utilizó un cromatógrafo de gases Thermo Scientific™ TRACE™ 1310 equipado con un detector de nitrógeno y fósforo. La columna usada fue de HP-5 (5% fenilmetilsilicona), de 30 m \times 0,25 mm I.D \times 0,25 μ m; la rampa de temperatura del horno fue la siguiente: una temperatura inicial de 150 °C/1 minuto, después un aumento a una velocidad de 5 °C/min hasta llegar a los 300 °C/5 min de temperatura final, con un tiempo de ejecución de 36 minutos. La temperatura del inyector fue de 250 °C y se usó el modo de inyección sin división (*splitless*); el volumen de inyección fue de 1 μ L. El gas de arrastre fue el nitrógeno (99,999% de pureza). La temperatura del detector fue de 290 °C y el flujo de la columna de 1,0 mL/min.

Resultados

En primer lugar, se hizo una prueba con la metodología de extracción QuEChERS para valorar el efecto de preconcentración de los analitos en muestras de *Persea americana* Mill. cv. analizadas por GC - μ ECD. Las muestras de plaguicidas presentes en la cáscara de aguacates Hass obtenidas con esta metodología se compararon con aquellas que presentaban un efecto significativo de preconcentración (Figura 1). Por otro lado, dicho efecto se analizó con base en los valores obtenidos en su relación con el porcentaje de área para cada uno de los plaguicidas como se observa en la tabla 1 por el aumento

de los porcentajes de área frente a la presencia de un proceso de preconcentración en la muestra, lo que tuvo un efecto significativo en el aumento de la señal de los analitos y, por consiguiente, en su concentración. A partir de ese resultado se hizo indispensable incorporar la preconcentración en la metodología de trabajo descrita. En consecuencia, al final de la fase de limpieza se tomaron 2 mL del contenido y se sometió a evaporación todo el solvente para luego reconstituir el analito en 1 mL de este (o, idealmente, menos cantidad), para luego hacer un análisis cromatográfico de la muestra y comprobar el aumento en la correlación entre señal y concentración.

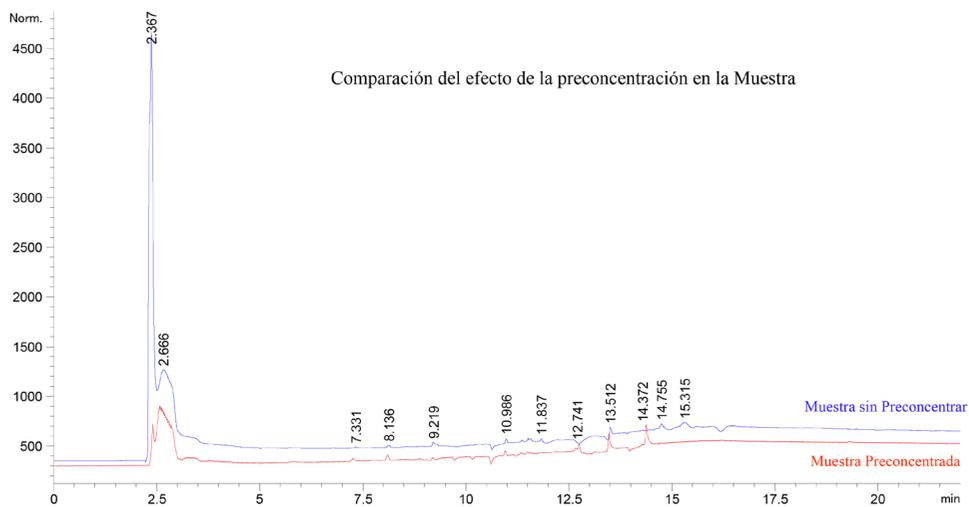


Figura 1. Cromatogramas de las pruebas preliminares de extracción con QuEChERS y valoración del efecto de preconcentración de los analitos en muestras de *Persea americana* Mill. cv. analizadas por GC- μ ECD

Tabla 1. Comparación del efecto de preconcentración de la muestra en cáscara de aguacate Hass con base en el porcentaje de área

Número de pico	Muestra de cáscara sin preconcentrar		Número de pico	Muestra de cáscara preconcentrada	
	Tiempo de retención	Porcentaje de área		Tiempo de retención	Porcentaje de área
1	7,331	0,10437	1	7,262	0,62896
2	8,136	0,14368	2	8,092	0,96048
3	9,219	0,34833	3	9,187	0,46810
4	10,986	1,23074	4	10,946	7,71288
5	11,371	0,12327	5	11,330	2,10244
6	11,524	0,17936	6	11,482	0,96746
7	11,586	0,14994	7	11,549	1,11016
8	11,837	0,21713	8	11,805	1,17625
9	12,231	0,59943	9	12,660	0,69457
10	13,512	0,84763	10	12,741	1,29712
11	14,755	0,72036	11	13,464	2,73842
12	15,315	1,46237	12	14,372	4,02574

Por otro lado, para evaluar la presencia de plaguicidas y las señales propias de la matriz obtenidas al final del proceso de extracción, se compararon muestras de cáscara dopadas y sin dopar (**Figura 2**) y de pulpa (**Figura 3**) utilizando una mezcla de compuestos organoclorados a una concentración de 10 ppm con C₁₈ como fase adsorbente. Así se pudo corroborar la presencia de plaguicidas en cáscaras y pulpa, cuya comparación se presenta en las **tablas 2**.

En la metodología QuEChERS es común el uso de C₁₈ como fase adsorbente en la etapa de limpieza de interferentes en la muestra, por ello se hizo un análisis comparativo entre su uso como fase adsorbente convencional y el de arcillas funcionales (MMT-Br) para establecer con cuál de dichas fases se obtenían mejores resultados en la extracción de los plaguicidas presentes en la matriz. Cabe resaltar que para dicha comparación se incorporó la etapa de preconcentración en la metodología QuEChERS para luego reemplazar los 300

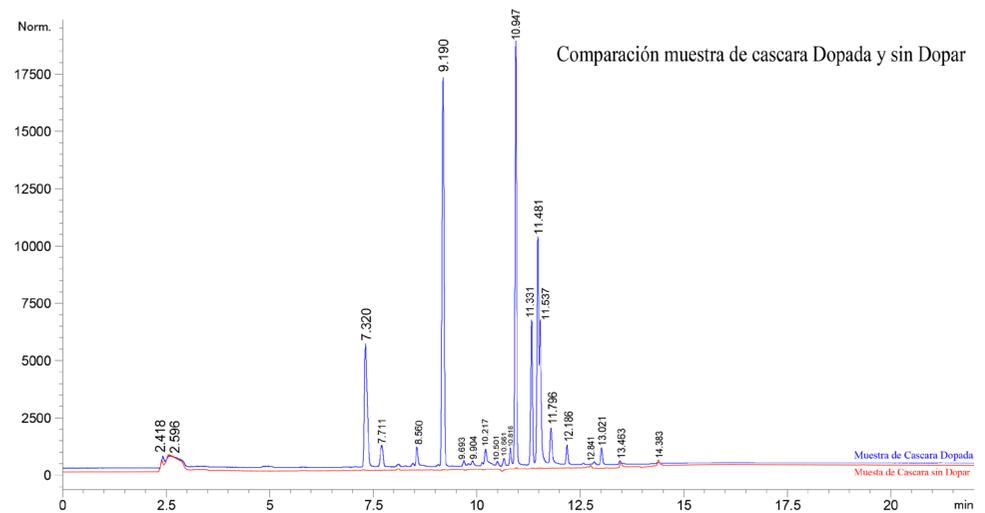


Figura 2. Comparación de las muestras de cáscara dopada y sin dopar de aguacate Hass (*Persea americana* Mill. cv.) analizadas por GC- μ ECD

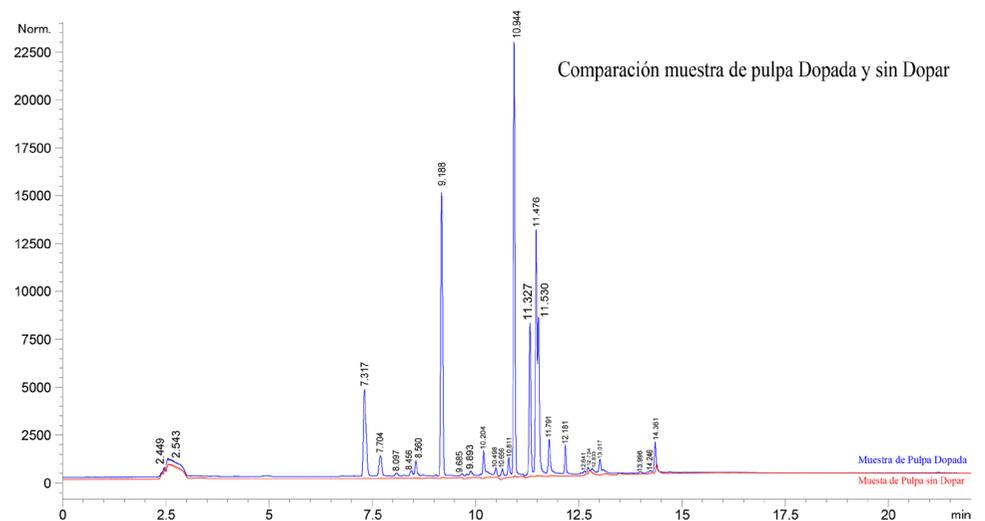


Figura 3. Comparación de las muestras de pulpa dopada y sin dopar en aguacate Hass (*Persea americana* Mill. cv.) analizadas por GC- μ ECD

mg de C₁₈ por 300 mg de arcillas funcionales (MMT-Br). La extracción de plaguicidas se hizo tanto en cáscara como en pulpa de aguacate Hass y luego se analizaron las diferencias entre los resultados obtenidos con cada fase adsorbente (**Figuras 4 y 5**).

En la **figura 4** se puede observar que hubo una mejor extracción de los residuos de plaguicidas organoclorados en la cáscara al utilizar las arcillas funcionales; también se notó un aumento en la relación entre señal y concentración de cada uno de los analitos y se evidenció que estos aparecían mucho más pronunciados cuando se utilizaron las arcillas como fase adsorbente que al emplear el C₁₈. Otra característica observada fue la aparición de muchos más picos en el cromatograma que reportó el uso de arcillas funcionales como adsorbente, lo que indica una mayor eficacia en la extracción de los diferentes plaguicidas presentes en la matriz.

Para saber cuál de las dos fases adsorbentes generó una mejor resolución en los compuestos obtenidos, se elaboró una tabla con los picos obtenidos con cada fase reflejados en los cromatogramas, así como su respectivo tiempo de retención y su ancho de pico, para determinar la resolución promedio y establecer la fase adsorbente con la que se obtuvo una mejor separación de los compuestos. Para ello se determinaron los picos del cromatograma más cercanos, lo que refleja, a su vez, su resolución; estos picos se presentan en negrilla en la **tabla 2**, y en la columna siguiente se presenta su resolución. Una vez determinados los picos cercanos y haber calculado su resolución, se procedió a determinar la resolución promedio para indicar con cuál de las dos fases se logró una mejor separación en los picos de compuestos muy cercanos.

La resolución promedio con fase adsorbente C₁₈ fue de 1,83 y con arcillas funcionales de 3,44, lo que indica que el reemplazo del C₁₈ por dichas arcillas permitió una mejor resolución y, además, se obtuvieron muchos más picos en el cromatograma. Para comparar

Tabla 2. Determinación de la resolución promedio de los picos obtenidos en el cromatograma de la figura 4 al utilizar C₁₈ y arcillas funcionales como fase adsorbente en cáscara de aguacate Hass

Número de pico	Metodología QuEChERS con C ₁₈ como fase adsorbente			Número de pico	Metodología QuEChERS con arcillas funcionales como fase adsorbente		
	Tiempo de retención	Ancho de pico	Resolución		Tiempo de retención	Ancho de pico	Resolución
1	7,262	0,0786		1	6,994	0,0900	
2	8,092	0,0651		2	8,102	0,0864	
3	9,187	0,0650		3	8,724	0,0489	
4	10,946	0,2299		4	8,864	0,0876	2,05
5	11,330	0,1238	2,17	5	9,192	0,0570	
6	12,660	0,0602		6	9,462	0,0457	5,26
7	12,741	0,0496	1,48	7	9,751	0,0824	4,51
8	13,464	0,0569		8	10,378	0,0883	
9	14,372	0,0668		9	10,959	0,0748	
				10	11,342	0,0805	
				11	12,737	0,1510	
				12	12,956	0,0498	2,18
				13	13,392	0,0399	
				14	14,383	0,0825	
				15	14,625	0,0689	3,20
				16	15,583	0,1327	
	Resolución promedio usando C ₁₈		1,83	Resolución promedio usando arcillas funcionales			3,44

Tabla 3. Pruebas estadísticas aplicadas para la comparación de la efectividad de las fases adsorbentes en la extracción de plaguicidas en cáscara

Número de pico	Metodología QuEChERS con C ₁₈ como fase adsorbente para cáscara		Número de pico	Metodología QuEChERS con arcillas funcionales como fase adsorbente para cáscara	
	Tiempo de retención	Porcentaje de área		Tiempo de retención	Porcentaje de área
1	7,262	0,62896	1	6,994	1,56589
2	8,092	0,96048	2	8,102	0,44709
3	9,187	0,46810	3	8,724	0,23262
4	10,946	7,71288	4	8,864	2,51179
5	11,330	2,10244	5	9,192	0,22548
6	12,660	0,69457	6	9,462	0,35484
7	12,741	1,29712	7	9,751	1,54859
8	13,464	2,73842	8	10,378	0,80827
9	14,372	4,02574	9	10,959	0,89141
			10	11,342	0,44104
			11	12,737	4,32258
			12	12,956	1,57224
			13	13,392	1,19558
			14	14,383	4,09639
			15	14,625	1,05990
			16	15,583	0,91803
Promedio		2,29208	Promedio		1,47468
Desviación estándar		2,34611	Desviación estándar		1,18578
Varianza		5,50423	Varianza		1,40608

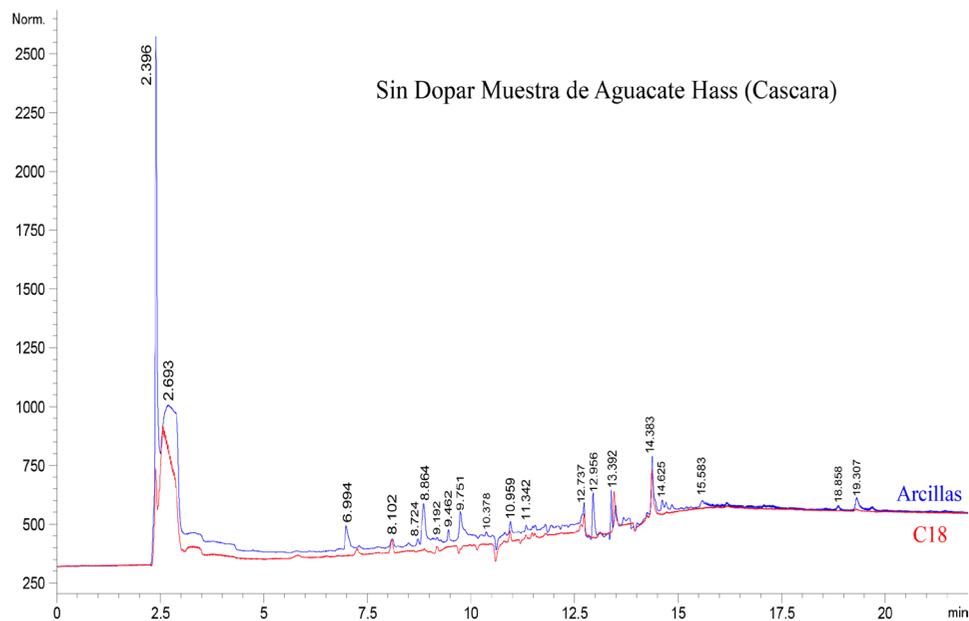


Figura 4. Cromatogramas de las pruebas preliminares de extracción con QuEChERS y análisis mediante GC – μECD para el estudio de plaguicidas organoclorados en la cáscara de *Persea americana* Mill. cv.

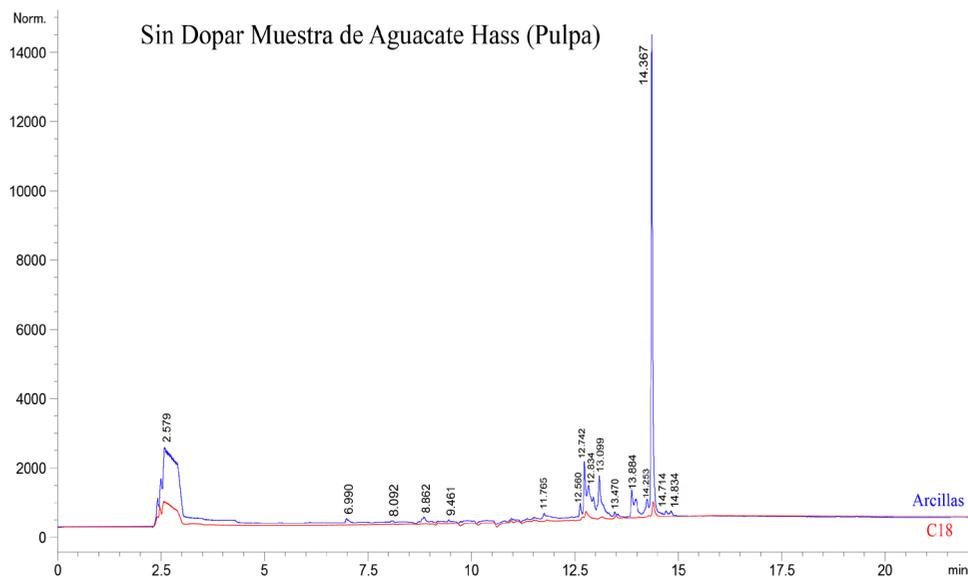


Figura 5. Cromatogramas de las pruebas preliminares de extracción con QuEChERS mediante análisis GC – μ ECD para el estudio de plaguicidas organoclorados en la pulpa de *Persea americana* Mill. cv.

la eficacia de ambas fases adsorbentes, también se analizaron los porcentajes de área reportados para cada uno de los picos obtenidos en el cromatograma de las muestras de cáscara (**Tabla 3**) aplicando la prueba estadística F para determinar la igualdad en las varianzas y el estadístico T de Student para comparar ambas fases.

Prueba F

$$F_{\text{experimental}} = 3,91457 > F_{\text{teórico}} = 2,44706$$

Prueba t

$$t_{\text{experimental}} = 0,99230 < t_{\text{teórico}} = 2,22813$$

Con la prueba estadística F de comparación de las varianzas de ambos datos frente a los porcentajes de áreas obtenidos con las dos fases adsorbentes, se registraron diferencias significativas, por lo que se aplicó la prueba estadística t de Student para muestras con varianzas desiguales y se concluyó que no había diferencias significativas entre las fases adsorbentes en cuanto a los porcentajes de área obtenidos para los picos. Dada esta ausencia de diferencias en el porcentaje de área obtenido, se determinó cualitativamente que la fase adsorbente a base de arcillas funcionales permitía una mejor extracción de los residuos de plaguicidas en la cáscara del aguacate Hass, pues presentó una mayor cantidad de picos en el cromatograma (**Figura 4**).

En la pulpa también se determinó si la membrana fue permeable a los residuos de plaguicidas. Como se sabe, esta se caracteriza por ser muy lipofílica por su alto contenido de ácidos grasos. En este análisis se utilizó el mismo procedimiento; en la **figura 5** se observa una mejor extracción de los residuos de plaguicidas organoclorados presentes en la pulpa con las arcillas funcionales, así como un aumento en la relación entre señal y concentración de cada uno de los analitos, los cuales fueron mucho más pronunciados al utilizar las arcillas comparadas con el C_{18} . Otra característica evidente fue la aparición de muchos más picos en el cromatograma que reportó el uso de arcillas funcionales como adsorbente, lo que indica una mayor eficacia en la extracción de los diferentes plaguicidas en la matriz. Se comparó, asimismo, cuál de las dos fases era mejor para la resolución en los compuestos obtenidos enumerando en una tabla los picos obtenidos con cada fase en los cromatogramas y estableciendo su respectivo tiempo de retención y su ancho de pico para determinar la resolución promedio. Con base en estos datos se determinó cuáles picos

eran muy cercanos para así calcular su resolución; estos picos aparecen en la **tabla 4** en negrilla, y en la columna siguiente se presenta su resolución. Una vez determinados los picos cercanos, y calculada su resolución, se estableció la resolución promedio con lo cual se determinó cuál de las dos fases permitía una mejor separación en los picos cercanos.

En los cromatogramas de las **figuras 4 y 5** se evidencia la presencia de varios plaguicidas organoclorados. Se observó un aumento de la concentración del compuesto con un tiempo de retención de 14,367 minutos a partir de su extracción utilizando las arcillas funcionales como fase adsorbente y después del proceso de preconcentración, como se ve en el cromatograma de la **figura 5**. Debe anotarse que aún se desconoce la identidad de dicho compuesto y, por ello, no se hizo la curva de calibración para determinar su concentración.

Se obtuvo una resolución promedio de 1,36 con la fase adsorbente C_{18} y de 2,12 con arcillas funcionales, lo que indica que el reemplazo de C_{18} por estas permitió una mejor resolución y muchos más picos en el cromatograma. En la **tabla 5** se presenta la comparación de la eficacia de las dos fases adsorbentes con base en los porcentajes de área reportados para cada uno de los picos obtenidos en el cromatograma de la pulpa con el uso de C_{18} y de las arcillas funcionales. Se aplicó la prueba estadística F para determinar la igualdad en las varianzas y el estadístico t de Student para comparar ambas fases adsorbentes y así determinar con cuál de las dos se obtenía un mejor porcentaje de área de los analitos presentes.

$$\begin{aligned} & \text{Prueba F} \\ & F \text{ experimental} = 16,92308 > F \text{ teórico} = 3,14037 \\ & \text{Prueba t} \\ & t \text{ experimental} = 1,33776 < t \text{ teórico} = 2,05553 \end{aligned}$$

Tabla 4. Determinación de la resolución promedio de los picos obtenidos en el cromatograma de la Figura 5 al utilizar C_{18} y arcillas funcionales como fase adsorbente en pulpa de aguacate Hass

Número de pico	Metodología QuEChERS con C_{18} como fase adsorbente			Número de pico	Metodología QuEChERS con arcillas funcionales como fase adsorbente		
	Tiempo de retención	Ancho de pico	Resolución		Tiempo de retención	Ancho de pico	Resolución
1	8,096	0,0519		1	6,990	0,0733	
2	9,192	0,0693		2	8,092	0,1299	
3	11,809	0,1573		3	8,862	0,1042	
4	12,664	0,0619		4	9,461	0,0497	
5	12,748	0,0993	1,04	5	11,765	0,1856	
6	13,131	0,1164		6	12,560	0,0697	
7	13,465	0,0616		7	12,742	0,0457	3,15
8	14,260	0,0665		8	12,834	0,0846	1,41
9	14,371	0,0660	1,67	9	12,955	0,0556	1,73
				10	13,099	0,0984	1,87
				11	13,470	0,0568	
				12	13,884	0,0506	
				13	13,981	0,0906	1,37
				14	14,253	0,0720	3,35
				15	14,367	0,0410	2,02
				16	14,714	0,0496	
				17	14,834	0,0653	2,09
	Resolución promedio usando C_{18}		1,36	Resolución promedio usando Arcillas funcionales			2,12

Tabla 5. Pruebas estadísticas aplicadas para la comparación de la efectividad de las fases adsorbentes en la extracción de plaguicidas en la pulpa

Número de pico	Metodología QuEChERS con C ₁₈ como fase adsorbente para pulpa		Número de pico	Metodología QuEChERS con arcillas funcionales como fase adsorbente para pulpa	
	Tiempo de retención	Porcentaje de área		Tiempo de retención	Porcentaje de área
1	8,096	0,14945	1	6,990	0,39042
2	9,192	0,80091	2	8,092	0,44504
3	11,809	1,93503	3	8,862	0,85408
4	12,664	1,16017	4	9,461	0,14523
5	12,748	5,20994	5	11,765	2,29119
6	13,131	1,79919	6	12,560	0,39456
7	13,465	1,07276	7	12,742	3,35398
8	14,260	0,73504	8	12,834	3,84641
9	14,371	5,70537	9	12,955	1,66267
			10	13,099	5,66831
			11	13,470	0,46765
			12	13,884	1,73656
			13	13,981	2,04817
			14	14,253	1,73118
			15	14,367	24,47938
			16	14,714	0,18908
			17	14,834	0,30991
	Promedio	2,06310		Promedio	4,57618
	Desviación estándar	2,00217		Desviación estándar	8,649
	Varianza	4,00868		Varianza	67,83993

La prueba estadística F de comparación de las varianzas en los porcentajes de áreas obtenidos con las dos fases adsorbentes evidenció diferencias significativas, por lo que se procedió a aplicar la prueba estadística t de Student para muestras con varianzas desiguales y se concluyó que no había diferencias significativas en cuanto a los porcentajes de área obtenidos para los picos con el uso de las dos fases adsorbentes. Dado que estadísticamente no hubo diferencias en el porcentaje de área obtenido, se determinó cualitativamente que la fase adsorbente a base de arcillas funcionales permitió una mejor extracción de los residuos de plaguicidas en la pulpa del aguacate Hass por presentar una mayor cantidad de picos en dicho cromatograma (**Figura 5**).

Por otro lado, se intentó determinar la presencia de picos en la matriz tanto de cáscara como de pulpa mediante la inyección individual de estándares externos de compuestos organoclorados (dieldrín, aldrín, hexaclorobenceno (HCB), heptacloro epóxido y betaendosulfán) para constatar su presencia en el cromatograma obtenido a partir de dichas matrices mediante la comparación de los tiempos de retención. En la **figura 6** se evidencia la presencia de un pico con un tiempo de retención parecido al del estándar externo HCB, así como otro con un tiempo de retención cercano al del estándar de heptacloro epóxido.

Se presentan, además, otras señales a partir de los 12,5 minutos que no se sabe aún a qué corresponden, lo que evidencia la necesidad de hacer un proceso de caracterización por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC - MS), con el fin de establecer la identidad estructural de estos compuestos y verificar la existencia de los compuestos con un tiempo de retención cercano a los estándares inyectados.

En la **figura 7** se aprecia un pico con un tiempo de retención parecido al del estándar externo HCB, así como señales a partir de los 12,5 minutos que aún se desconocen, por lo que es necesario caracterizarlas mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC - MS) para establecer su identidad estructural y verificar la existencia de los compuestos con un tiempo de retención cercano al estándar HCB.

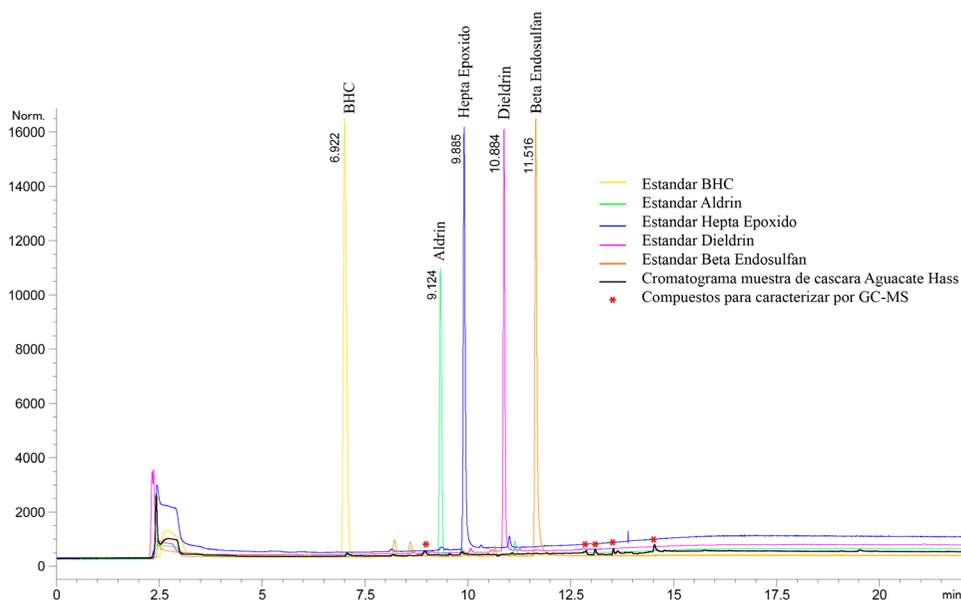


Figura 6. Comparación de los tiempos de retención de cinco estándares externos y el perfil cromatográfico obtenido para la extracción de plaguicidas presentes en cáscara de aguacate Hass usando arcillas funcionales como fase adsorbente

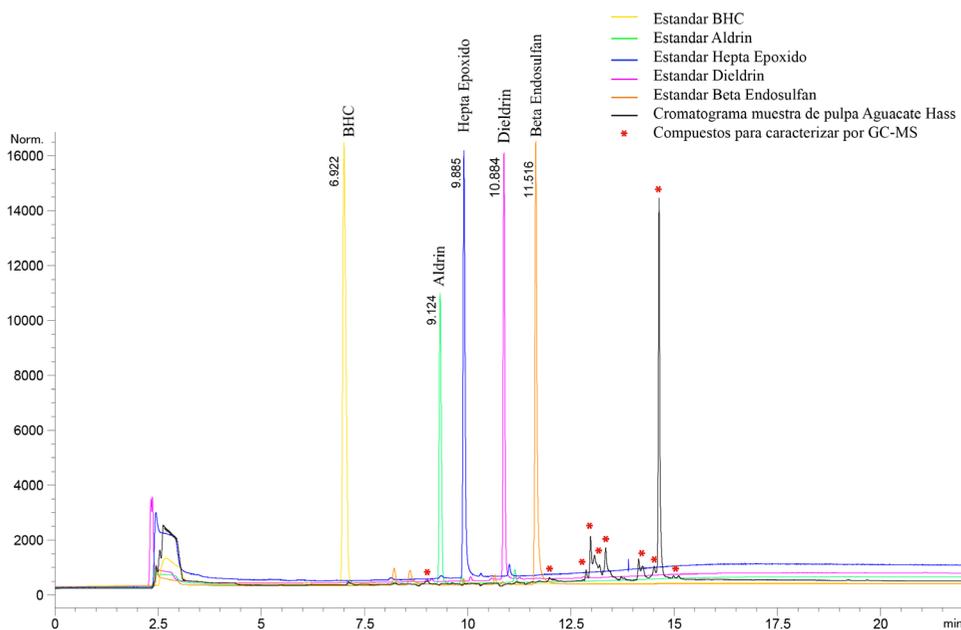


Figura 7. Comparación de los tiempos de retención de cinco estándares externos y el perfil cromatográfico obtenido para la extracción de plaguicidas presentes en pulpa de aguacate Hass usando arcillas funcionales como fase adsorbente

En el caso del análisis de los plaguicidas organofosforados, este se hizo de forma cualitativa mediante cromatografía de gases con detector de nitrógeno y fósforo. De esta manera se pudo analizar la presencia de algunos plaguicidas organofosforados en las muestras, pero aún deben compararse las muestras dopada y sin dopar para analizar las señales propias de la matriz. Los cromatogramas obtenidos de este análisis preliminar en la cáscara y la pulpa de aguacates Hass se presentan en la **figura 1S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1235/2982>. Se observa que es poca la cantidad de plaguicidas organofosforados detectada en la cáscara, pero que hubo un aumento en la señal de los plaguicidas y en el número de picos al utilizar las arcillas en lugar del C_{18} , lo que confirma una mejor extracción con el adsorbente a base de arcillas funcionales. Asimismo, se evidenció que la extracción de los plaguicidas que permearon la membrana fue mayor con las arcillas, y que aparecieron nuevos picos.

Discusión

Los resultados arrojados por el GC – μ ECD en muestras de cáscara y pulpa evidenciaron que hubo una mayor presencia de analitos en la pulpa que en la cáscara. Desde el punto de vista de la fase estacionaria, se notó claramente la capacidad que tiene la arcilla en comparación con el C_{18} . Además, el análisis mediante el uso de arcilla mostró picos con gran resolución y mayor cantidad de analitos que con el C_{18} .

En el análisis de la pulpa y la cáscara con GC – μ ECD y GC – NPD se demostró que la extracción con arcillas permitió una buena eliminación de las interferencias y, por ende, la resolución de sus picos. Además, la mayor presencia de analitos en la pulpa que en la cáscara se debe a que la pulpa se caracteriza por ser muy lipofílica debido a su alto contenido de ácidos grasos, por lo que los analitos se difunden desde la cáscara hacia el interior del fruto. En cuanto a la cáscara, la presencia de analitos fue menor, muy posiblemente por la lixiviación de la cáscara durante el proceso de cosecha y de transporte, o porque parte de ellos puede ingresar al interior del fruto.

Uno de los compuestos organoclorados detectó por GC – μ ECD en ambas fases (arcilla y C_{18}) registró un tiempo de retención de 14,367 minutos en pulpa y en la pulpa su extracción con una fase adsorbente de arcillas funcionales fue mucho más intensa, lo que responde a la presencia de compuestos organoclorados en ambas partes de la matriz de aguacate Hass.

Este estudio hace parte de una investigación en curso y restan muchos más ensayos con muestras comerciales y con las proporcionadas directamente por pequeños y grandes productores. Por ello es necesario elaborar una curva de calibración que permita análisis cuantitativos de los analitos determinados en esta matriz. Asimismo, es necesario hacer análisis mediante GC – MS para identificar los diferentes compuestos y luego utilizar estándares externos en las respectivas curvas de calibración.

Conclusiones

Se puede concluir que: la metodología QuEChERS modificada fue efectiva para la extracción de los plaguicidas y garantizó una buena resolución y la eliminación de interferencias que pueden presentarse en dicha matriz biológica; la aplicación de arcillas funcionales como fase adsorbente en esta metodología tuvo resultados muy prometedores como método para la extracción de compuestos organoclorados y organofosforados en matrices complejas; la presencia de plaguicidas tanto en cáscara como en pulpa, pero con mayor prevalencia en pulpa, se evidenció cualitativamente, aunque se requieren más análisis para confirmar la presencia de estos compuestos. Próximamente se espera determinar cuantitativamente mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC - MS) la concentración de los analitos de interés, así como identificar el tipo de los que están presentes en ambas partes de la matriz.

Información suplementaria

Figura 1S. Cromatogramas pruebas preliminares de extracción con QuEChERS y análisis por GC – NPD usando C18 y arcillas funcionales como fase adsorbente, para la separación y detección de plaguicidas Organofosforados. A es el cromatograma del análisis en cáscara y B es el cromatograma en la pulpa de *Persea americana Mill. cv.* Vea la figura 1S en <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1235/2982>

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a la Vicerrectoría de Investigaciones y Posgrados de la Universidad de Caldas por la financiación del proyecto.

Contribución de los autores

GT: director del proyecto, gestionó la obtención de los recursos para la compra de los insumos necesarios para la elaboración del proyecto e hizo la corrección del análisis y del manuscrito. CAO y JPBA: analistas, aplicaron la metodología QuEChERS comparando el C₁₈ con las arcillas funcionales para la extracción de plaguicidas en aguacates Hass; hicieron el análisis de los datos, y redactaron y corrigieron el documento.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan no tener conflictos de intereses con respecto al contenido de este artículo.

Referencias

- Anastassiades, M., Lehotay, S., Stajnbaher, D., Schenck, F.** (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*. **86** (2): 412-431.
- AOAC.** (2007). Official Method 2007.01: Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate. *Journal of AOAC International*. **90** (2): 17-26. http://lib3.dss.go.th/fulltext/E_content/1060-3271/2007v90n2.pdf
- Benavides, S. & Echeverri, J.** (2014). Validación de un método para el análisis de residualidad de plaguicidas en Aguacate Hass. *Revista de La Facultad de Ciencias*. **5** (1): 170-183. Doi: 10.15446/rev.fac.cienc.v5n1.56185
- Cowan, A.K. & Wolstenholme, B. N.** (2016). Avocado. *Encyclopedia of food and health*, pp.294-300. Doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00049-0
- Cossio-Vargas, L. E., Salazar-García, S., González-Durán, I. J. L., Medina-Torres, R.** (2008). Fenología del Aguacate Hass en el clima semicálido de Nayarit, México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*. **14** (3): 319-324.
- Cruz, P.A., Ortiz, E., Dubiana, A., Gómez Vargas, J.A.** (2019). Impacto de la exportación del Aguacate Hass a países bajos y mercado chino. (Tesis de pregrado). Universidad Cooperativa de Colombia. Bogotá. Recuperado de <http://hdl.handle.net/20.500.12494/16694>
- Ferrer, A.** (2003). Intoxicación por plaguicidas. En *Anales del sistema sanitario de Navarra* (Vol. 26, pp. 155-171). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.
- Fenik, J., Tankiewicz, M., Biziuk, M.** (2011). Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *Trends Anal. Chem.* **30**: 814-826.
- Karam, M.Á., Ramírez, G., Montes, L.P.B., Galvan, J.M.** (2004). Plaguicidas y salud de la población. *CIENCIA ergo-sum, Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva*. **11** (3): 246-254.
- López, F. A., García, M. E., Fernández, S. I.** (2010). Procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva QuEChERS para el análisis de plaguicidas. *Universidad Politécnica de Valencia*, p. 8.
- Mandal, S., Poi, R., Bhattacharyya, S., Ansary, I., Roy, S. D., Hazra, D. K., Karmakar, R.** (2020). Multiclass Multipesticide Residue Analysis in Fish Matrix by a Modified QuEChERS Method Using Gas Chromatography with Mass Spectrometric Determination. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. **103** (1): 62-67. Doi: 10.5740/jaoacint.19-0205

- Melo, M. G., Carqueijo, A., Freitas, A., Barbosa, J., Silva, A. S.** (2020). Modified QuEChERS extraction and HPLC-MS/MS for simultaneous determination of 155 pesticide residues in rice (*Oryza sativa* L.). *Foods*. **9** (1): 18. Doi: 10.3390/foods9010018
- Obando, M., Cárdenas, V., Casanova, H., Montaña, D., Giraldo, L. F., Cardona, W., Rosero-Moreano, M.** (2016). Arcillas naturales funcionalizadas con líquidos iónicos para micro-extracción de ocratoxina A por membrana hueca empacada. *Scientia Chromatographica*. **8** (2): 129-136. Doi: 10.4322/sc.2016.024
- Páez, M. & Martínez, J.** (2015). Implementación de la metodología QuEChERS en el análisis de residuos de plaguicidas en maíz blanco (*Zea mays*). *Temas Agrarios*. **20**: 30-42. Doi: 10.21897/rta.v20i2.756
- Serpa, A. M., Echeverri, A., Lezcano, M. P., Vélez, L. M., Ríos, A. F., Hincapié, G. A.** (2014). Extracción de aceite de aguacate variedad "Hass" (*Persea americana* Mill) liofilizado por prensado en frío. *Revista Investigaciones Aplicadas*. **8** (2): 113-123.
- Tovar, M. Á. O.** (2003). Valor nutricional de la pulpa fresca de aguacate Hass. In *Proceedings V World Avocado Congress (Actas V Congreso Mundial del Aguacate)* (pp. 741-748).