

Recibido: 20 octubre 2013. Aceptado: 15 diciembre 2013

## Desarrollo y validación de un método verde para la extracción y cuantificación de residuos de cipermetrina en tejido animal

### Resumen

En este trabajo se desarrolló y validó un método simple, amigable ambientalmente y efectivo, para la extracción y cuantificación de cipermetrina en muestras de bovino (hígado, grasa perirrenal y músculo) utilizando dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) y cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID). Se evaluaron diferentes parámetros del método, tales como el agente dispersante, el disolvente de extracción y el volumen de disolvente. Los mejores resultados para la extracción de cipermetrina por MSPD fueron: 0,20 g de muestra macerados con 0,80 g de sílica gel y extraídos con 5,00 mL de acetona. El procedimiento propuesto fue validado mostrando comportamiento lineal en el intervalo de 10,20-400,40 µg/L ( $R^2=0,9988$ ). Los límites de detección y cuantificación fueron 2,00 y 5,70 µg/L respectivamente, con una desviación estándar relativa de 0,0875 ( $n=5$ ). Este método permite determinar cipermetrina hasta niveles traza en muestras de tejido animal, con una recuperación de 98,96%.

**Palabras Claves:** Dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), cipermetrina, extracción, cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID), tejido animal.

## Development and validation of a green method for the extraction and quantification of cypermethrin residues in animal tissue

### Abstract

In the present study a simple, effective and environmentally friendly method was developed and validated for the extraction and quantification of cypermethrin in animal tissue (meat, fat and liver) using matrix solid-phase dispersion (MSPD) and gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). Different parameters of the method were evaluated, such as dispersant, extractive solvent and solvent volume. The best results for the extraction of cypermethrin by MSPD were 0.20 g of sample with 0.80 g of silica gel and 5.00 mL of acetone as eluting solvent. The proposed procedure was validated showing linear behavior in the interval of 10.20 to 400.40 µg/L ( $R^2= 0.9988$ ). Detection and quantification limits ranged from 2.00 and 5.70 µg/L respectively, with a standard deviation of 0.0875 ( $n=5$ ). This method enables to determine cypermethrin at trace level in animal tissue samples, with a recovery of 98.96%.

**Keywords:** Matrix solid-phase dispersion (MSPD), cypermethrin, extraction method, gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID), animal tissue.

## Desenvolvimento e validação do método verde para a extração e quantificação dos resíduos da cipermetrina no tecido animal

### Resumo

Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método verde para extração e quantificação de cipermetrina em amostras de fígado, gordura perirrenal e músculo em gado bovino, por meio da técnica de dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) e cromatografia de gases com detecção de ionização de chama (GC-FID). Foram avaliados diferentes parâmetros do método, como dispersante, extração com solvente e volume de solvente. Os melhores resultados para a extração da cipermetrina por MSPD foram 0.20 g da amostra macerada com 0.80 g de gel de sílica e extraiu-se com 5.00 mL de acetona. O método proposto foi validado mostrando um comportamento linear na gama testada (10.20-400.40 µg/L) com  $R^2$  de 0.9988. Os limites de detecção e de quantificação foram 2.00 e 5.70 µg/L, respectivamente, com um desvio padrão de 0.0875 ( $n = 5$ ). O método proposto neste trabalho permitiu determinar níveis traza da cipermetrina em amostras de tecidos animais, com uma recuperação de 98.96%.

**Palavras chave:** Dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), cipermetrina, extração, cromatografia de gases com detecção de ionização de chama (GC-FID), tecido animal.

## Introducción

Los pesticidas piretroides son compuestos químicos que presentan propiedades que disminuyen, alteran o inhiben diferentes procesos biológicos. Están diseñados para combatir diversas plagas y malezas que atacan los cultivos agrícolas y se usan para controlar la vegetación no deseada en sistemas acuáticos (1). Son los más utilizados en la agricultura, la silvicultura, la horticultura e industria textil, además son ampliamente usados en cultivos de arroz, maíz, soja y pastos que son fuente de alimento para el ganado (2) que consume más del 10% de su peso en pasturas, esto representa un riesgo potencial en la medida en la que estas sustancias pueden pasar a través de la cadena alimenticia del pasto al animal y de este al humano (3, 4). Algunos piretroides como la cipermetrina están registrados en una gran variedad de formulaciones para el control de pulgas y garrapatas en animales, y para el tratamiento de instalaciones donde se crían con la finalidad de controlar las moscas (5), su uso excesivo puede ocasionar que el pesticida se logre bioacumular en los tejidos de los bovinos que posteriormente son consumidos por los humanos, situación que podría ser la causa de muchas enfermedades (3).

La principal fuente proteica en la dieta humana es de origen animal, especialmente la carne de bovino, este tejido debe estar libre de cualquier tipo de sustancias xenobióticas, razón por la cual resulta importante establecer técnicas analíticas que por un lado permitan su detección y cuantificación en carne, y por el otro favorezcan la implementación de medidas que garanticen la calidad e inocuidad de este producto. De esta manera es posible impactar positivamente la salud humana y la producción animal, logrando mejorar la competitividad y aumentando las posibilidades para acceder a los mercados internacionales con mejores precios.

En los últimos años se han llevado a cabo estudios de piretroides en diferentes muestras utilizando técnicas de extracción como ultrasonido, extracción asistida por microondas, extracción soxhlet clásica o automatizada, extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME) y dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) (6, 7). Aunque en un principio MSPD parece muy similar a la SPE, existen claras diferencias entre ambas. En MSPD se consigue una completa disrupción y dispersión de la muestra en partículas de

pequeño tamaño, proporcionando una superficie mejorada para la posterior extracción de la muestra, mientras que en SPE la disrupción de la muestra debe llevarse a cabo en un paso previo, ya que la muestra debe ser líquida para que se pueda aplicar la extracción en fase sólida. La muestra suele quedar retenida en la parte superior de la columna cuando se realiza la SPE; por el contrario, en MSPD la muestra se dispersa por toda la columna. Finalmente, las interacciones físicas y químicas de los componentes del sistema son mayores en MSPD (6, 8).

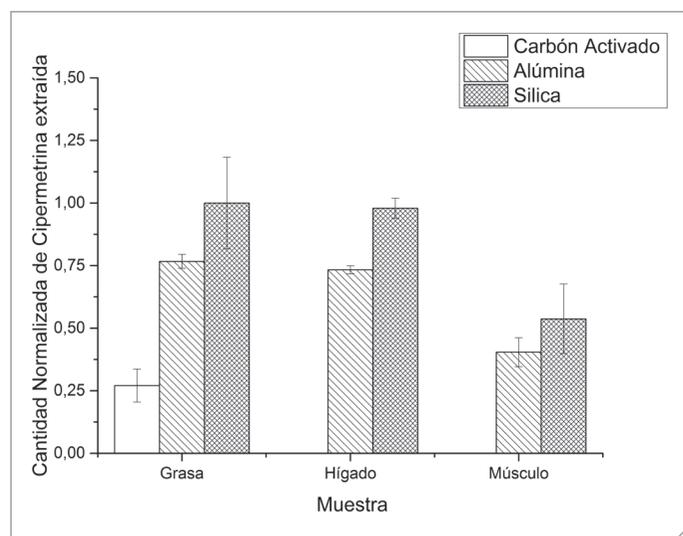
Debido al contenido de grasa de las muestras objeto y a la cantidad disponible de las mismas, en este trabajo se decidió utilizar la técnica MSPD ya que disminuye el tiempo de análisis, el tamaño de la muestra y el consumo de disolventes, además es idónea para muestras biológicas que son particularmente complejas (9, 10). Por lo anterior, el presente artículo tiene como finalidad establecer un método verde estandarizado para determinar la cantidad de cipermetrina presente en diferentes tejidos de ganado bovino; este método puede ser utilizado en posteriores estudios y en el control de calidad de este producto alimenticio. Según la comisión europea los límites máximos de residuos de cipermetrina son 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para hígado y músculo y 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para grasa, y estos han sido adoptados por la legislación colombiana (11).

## Materiales y métodos

### Instrumentos, materiales y reactivos

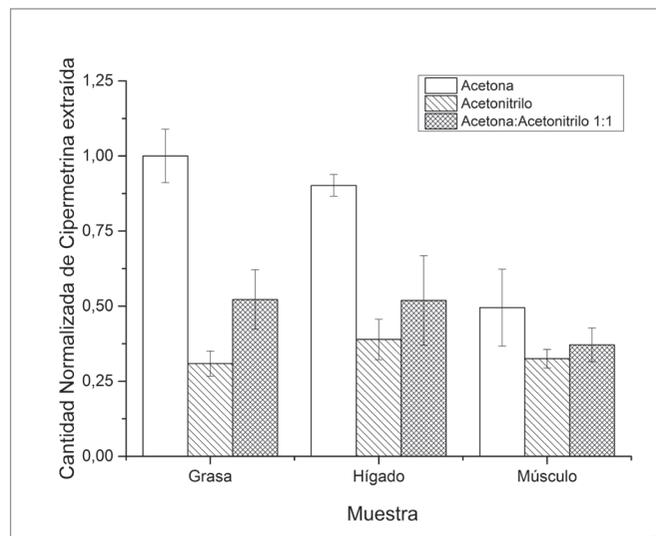
Para el presente estudio se empleó el estándar analítico cipermetrina (mezcla de isómeros) 95,10% (Fluka<sup>®</sup>), acetona y acetonitrilo grado HPLC (Merck<sup>®</sup>), Sulfato de sodio anhidro (Merck<sup>®</sup>), Carbón Activado (Sigma<sup>®</sup>), Sílica Gel (Merck<sup>®</sup>) y Alúmina (Sigma<sup>®</sup>).

Para la cuantificación de cipermetrina se empleó un cromatógrafo de gases Agilent 6890 con puerto de inyección split-splitless y detector de ionización de llama (FID), una columna capilar HP-5 de 60 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor. El gas portador fue helio (99,995%, Aga-fano<sup>®</sup>) a un flujo de 2,00 mL/min; la temperatura



**Figura 1.** Comparación de la eficiencia de la extracción por MSPD al utilizar diferentes fases estacionarias.

Los resultados están expresados como el contenido de Cipermetrina relativo al máximo valor encontrado



**Figura 2.** Comparación de la eficiencia de la extracción por MSPD al utilizar diferentes disolventes.

Los resultados están expresados como el contenido de Cipermetrina relativo al máximo valor encontrado

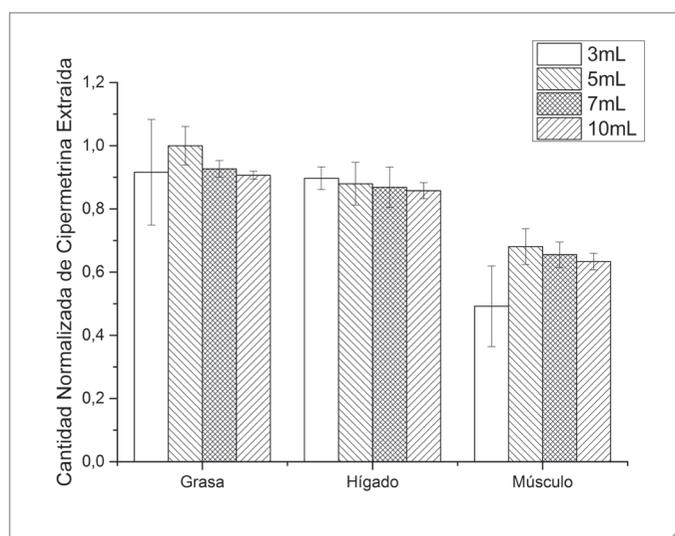
del inyector fue de 270 °C y la inyección se realizó en modo splitless. Se utilizó la programación utilizada por Cardona y colaboradores para muestras de tejido vegetal (12), en esta metodología se inicia a 200 °C y se mantiene esta temperatura por dos min; luego se aumenta a 20 °C/min hasta 270 °C y de ahí se aumenta a 3 °C/min hasta alcanzar los 273 °C, en donde se mantiene constante por un min; luego se lleva hasta 278 °C a 0,5 °C/min y por último a 10 °C/min hasta alcanzar una temperatura final de 290 °C, en la cual se deja por 4 min.

### Desarrollo del método de extracción

La evaluación de los parámetros para el proceso de extracción (Tipo de fase estacionaria, tipo de disolvente y cantidad del mismo) se llevaron a cabo utilizando 0,20 g de muestra de tejido (músculo, hígado o grasa perirrenal), adquirido en un mercado de la ciudad. El tejido se dopó hasta una concentración en muestra de 40,00 µg/kg de cipermetrina, esta muestra se dejó en reposo y refrigeración durante 24 h, posteriormente fue macerada y homogenizada con 0,80 g de la fase estacionaria (Sílica, alúmina o carbón activado). Esta mezcla se transfirió a una jeringa desechable de 5,00 mL, la cual contenía en su interior una capa de lana de vidrio, una de sulfato de sodio, una de la mezcla de la muestra con la fase estacionaria y finalmente una nueva capa de lana de vidrio; a continuación se compactó. Posteriormente se eluyó con 5,00 mL del disolvente (Acetona, acetonitrilo o mezcla de los dos) en un equipo de SPE (Máx 20”Hg) y se concentró a 1 mL. Una vez definido el disolvente, se evaluaron diferentes volúmenes (3, 5, 7 y 10 mL) del mismo. Los ensayos llevados a cabo se realizaron por triplicado. Enseguida se procedió a inyectar 1 µL de esta solución en el cromatógrafo para la determinación y cuantificación del analito.

### Resultados y discusión

Existen varios factores que influyen en la extracción mediante MSPD. Así, un tamaño de partículas muy pequeño alarga el proceso de elución y hace necesario aplicar un vacío excesivo para conseguir un flujo adecuado. El tipo y cantidad de adsorbente en relación a la cantidad de muestra es otro parámetro que hay que tener en cuenta. Igualmente el



**Figura 3.** Comparación de la eficiencia de la extracción por MSPD al utilizar diferentes cantidades de disolventes.

Los resultados están expresados como el contenido de Cipermetrina relativo al máximo valor encontrado

disolvente y el volumen del eluyente también influyen en la eficiencia del proceso de extracción mediante esta técnica (13).

### Selección del tipo de fase estacionaria

La distribución de los analitos entre la muestra dispersada y el disolvente de elución, depende de la fase estacionaria. La ruptura brusca de la muestra y la dispersión de sus componentes, solo se producirán en la medida que los componentes interactúen con las características químicas de la fase estacionaria; por estas razones y teniendo en cuenta que la muestra es sólida se decidió trabajar con una fase estacionaria en su mismo estado.

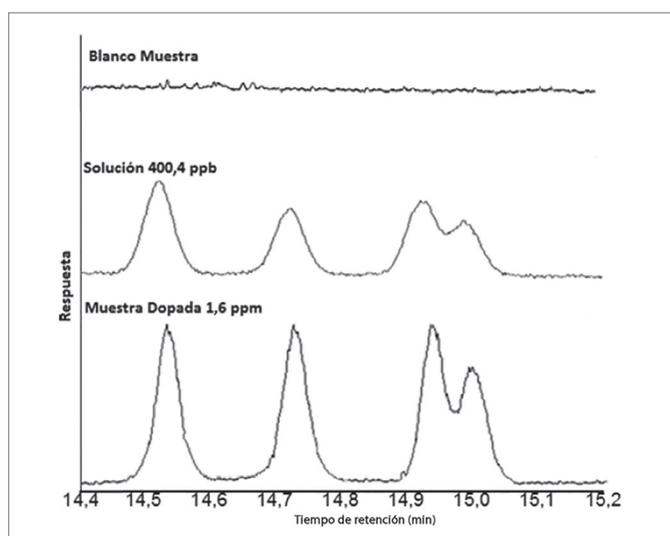
En la Figura 1, se observa que la fase estacionaria que dio mejores resultados de extracción fue la sílica gel, seguida de la alúmina y por último el carbón activado que presentó menor eficiencia de extracción.

La sílica (SiO<sub>2</sub>) y la alúmina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) son adsorbentes denominados de fase normal utilizados para la extracción de pesticidas, herbicidas y contaminantes prioritarios en matrices biológicas mediante MSPD. La sílica y la alúmina son polares, por tanto la cipermetrina, que es de moderada polaridad, eluye en mayor cantidad y a mayor velocidad en estas fases. Los materiales derivados de la sílica son los más empleados en la disrupción de la matriz en 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, actuando a su vez como agente desecante (13).

Cheng y colaboradores usaron un método por MSPD para la extracción de cipermetrina en tejido de porcinos, para ello utilizaron acetonitrilo como disolvente y alúmina como fase estacionaria, obteniendo una recuperación de 83,50%, que es menor a la obtenida usando acetona como disolvente de elución (14).

### Selección de tipo de disolvente

Al igual que en cromatografía o en SPE, la polaridad del disolvente es de gran importancia para determinar la velocidad y el orden de elución de los analitos del cartucho de MSPD. La correcta elección del disolvente y el diseño del perfil de elución permiten obtener extractos libres de impurezas por la retención de las mismas en la fase estacionaria (8).



**Figura 4.** Cromatograma de cipermetrina.

Como se observa en la Figura 2, la acetona fue la que presentó la mejor recuperación, seguida de la mezcla acetónitrilo:acetona (1:1) y del acetónitrilo. Dada la moderada polaridad de la cipermetrina y teniendo en cuenta la polaridad de la acetona, se entiende que esta se disuelva y eluya más rápidamente usando la acetona como disolvente de arrastre, seguido de la mezcla acetona-acetonitrilo y por último del acetónitrilo.

### Volumen de disolvente

Este factor debe evaluarse, pues varía la cantidad necesaria para la elución dependiendo de la aplicación, además debe ser examinado con cuidado para reducir el uso de disolventes y la coelución no intencional de las posibles interferencias que pueden hacer difícil la integración de la molécula de interés en el cromatograma.

Como se puede observar en la Figura 3, utilizando 3,00 mL de acetona, la cantidad eluida de cipermetrina es menor que la cuantificada utilizando 5,00 mL y las cantidades mayores a este volumen (7,00 y 10,00 mL) extraen una cantidad muy similar a la obtenida con 5,00 mL, pero con estos volúmenes disminuye notablemente la resolución de los cromatogramas obtenidos; además con estos volúmenes el gasto de disolventes es mayor.

Cheng y colaboradores, usaron 20,00 ml de una mezcla acetónitrilo-agua (85:15) en la determinación de piretroides en tejido de porcino, este volumen es mayor que el que presentó la mejor recuperación en este trabajo, el cuál fue de 5,00 ml (14).

### Validación del método analítico

Las condiciones recomendables para la extracción y determinación de cipermetrina en hígado, músculo y grasa perirrenal por MSPD-GC/FID son 0,20 g de muestra de tejido (músculo, hígado o grasa perirrenal), se maceran y homogenizan con 0,80 g de sílica. Esta mezcla se transfiere a una jeringa desechable de 5,00 mL, la cual 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 finalmente una nueva capa de lana de vidrio; a con-

**Tabla 1.** Datos de validación para el método MSPD-CG/FID

PARÁMETRO	VALOR
Ecuación	$Y = 0,0042 X + 0,2865$
Rango Lineal ( $\mu\text{g/L}$ )	10,20 – 400,40
n	7
Pendiente (m)	0,0042
Intercepto con el eje y (b)	0,2865
$R^2$	0,9988
LOD ( $\mu\text{g/L}$ )	2,00
LOQ ( $\mu\text{g/L}$ )	5,70
Recuperación (Grasa) (n=5)	98,98%
Recuperación (Hígado) (n=5)	97,53%
Recuperación (Músculo) (n=5)	97,46%
Desviación estándar	0,0875

LOD: Límite de detección.

LOQ: Límite de cuantificación.

tinuación se compacta. Posteriormente se eluye con 5,00 mL de acetona, en un equipo de SPE (Máx 20" Hg) y se concentra hasta 1,00 mL. Enseguida se procede a inyectar 1,00  $\mu\text{L}$  de esta solución en el cromatógrafo para la determinación y cuantificación de la cipermetrina. Un cromatograma obtenido en la determinación de cipermetrina es presentado en la Figura 4. Los parámetros de validación son presentados en la Tabla 1.

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

La linealidad se evaluó utilizando 7 concentraciones diferentes en el rango 10,20 – 400,40  $\mu\text{g/L}$  obteniendo un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0,9988 que exhibe una buena linealidad en el rango de concentraciones examinadas (Tabla 1). Los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

Los valores calculados de LOD (proporción señal a ruido de 3; S/N = 3) y LOQ (Proporción señal a ruido de 10; S/N = 10) fueron 2,00  $\mu\text{g/L}$  y 5,70  $\mu\text{g/L}$  respectivamente.

### Exactitud, precisión y reproducibilidad

Se evaluó la recuperación de cantidades conocidas de cipermetrina en muestras con tres concentraciones diferentes (221,10; 301,50 y 400,4  $\mu\text{g/L}$ ) en cada una de las muestras de hígado, músculo y grasa perirrenal. Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado. La precisión del método fue evaluada durante un día y los valores de repetibilidad se calcularon analizando muestras (n = 5) a una concentración de 5,00  $\mu\text{g/kg}$ .

En la Tabla 1 se puede observar una buena recuperación de 98,98%, 97,53% y 97,46% para grasa, hígado y músculo respectivamente.

### Comparación de la técnica de extracción validada con métodos tradicionales

Se compararon los resultados obtenidos para la extracción de fracciones de una misma muestra con MSPD frente a Soxhlet, como método de referencia, y ultrasonido. Los resultados obtenidos para ultrasonido y Soxhlet, expresados como recuperaciones frente a la concentración obtenida usando MSPD, se presentan en la Tabla 2. MSPD proporcionó valores análogos a Soxhlet y superiores a ultrasonido, siendo la primera técnica más sencilla y menos costosa. Con ultrasonido y MSPD se pueden extraer varias muestras simultáneamente, contrario a Soxhlet, en el cual solo se puede tratar una muestra por extracción.

En Soxhlet y MSPD se han integrado las etapas de limpieza en el proceso de extracción, minimizando la manipulación de los extractos y evitando así la pérdida de analito. Frente a MSPD, Soxhlet requiere un mayor consumo de disolvente (250 ml) por lo cual no es una técnica viable a pesar de ser una técnica convencional, la gran cantidad de disolvente usado proporciona una alta contaminación al ambiente. La cantidad de muestra (10 g) para Soxhlet es mucho mayor que para las otras dos técnicas estudiadas y el proceso de extracción dura 8 h comparado con 15 min por MSPD. Por lo anterior, MSPD ha demostrado que

**Tabla 2.** Comparación de la recuperación de cipermetrina por los tres métodos

Muestra	Soxhlet (%)	Ultrasonido (%)	MSPD (%)
Grasa	91,06	45,63	97,02
Hígado	94,40	69,02	95,33
Músculo	89,75	66,86	97,46

genera resultados equivalentes o mejores que Soxhlet y Ultrasonido y presenta grandes ventajas, puesto que reduce el consumo de disolventes orgánicos, que son tóxicos para la salud y el medio ambiente además de ser un método rápido, barato y que requiere poca cantidad de muestra.

## Conclusiones

El método propuesto es sencillo, requiere menor tiempo de análisis, disminuye el consumo de disolvente y genera menos residuos tóxicos, lo que lo hace una técnica ambientalmente amigable y más económica. La metodología desarrollada en este trabajo para la extracción y cuantificación de cipermetrina en hígado, músculo y grasa perirrenal, cubre el rango legislado. El método expuesto es recomendado para extracción y cuantificación de cipermetrina en muestras de tejido animal, ya que la recuperación para grasa, hígado y músculo fue de 97,02%, 95,33% y 97,46%, respectivamente.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de la República de Colombia, por su apoyo financiero a esta investigación bajo el macroproyecto titulado "Mejoramiento de la inocuidad de la agroindustria cárnica con relación a la presencia de sustancias xenobióticas en los subsistemas agrícola y pecuario", Según convenio MADR 2008 H2468-3968.

## Referencias

1. Bonasea, R.; Amé, M.; Wunderlin, D. Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquia River basin (Argentina). *Chemosphere*. 2013. **90**: 1860-1869.
2. Macedo, A.; Nogueira, A.; Govoni, S. Matrix solid-phase dispersion extraction for analysis of cypermethrin residue in cows' milk. *Chromatographia*. 2009. **69**: 571-573.
3. Bowman D.; Lynn, R. Parasitología para veterinarios. 8ª ed., España., Elsevier. pp 480. 2004.
4. Mudiam, M.; Jain, R.; Maurya, S.; Khan, H.; Bandyopadhyay, S.; Murthy, R. Low density solvent based dispersive liquid-liquid microextraction with gas chromatography-electron capture detection for the determination of cypermethrin in tissues and blood of cypermethrin treated rats. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2012. **895**: 65-70.
5. Anadón, A.; Martínez-Larrañaga, M. R.; Martínez, M. A. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *J. Veterinary*. 2009. **182**: 7-20.
6. Barker, S. Matrix solid-phase dispersion (MSPD). *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2007. **70**: 151-162.
7. Ledoux, M. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. *J. Chromatogr. A*. 2011. **1218**: 1021-1036.
8. Capriotti, A.; Cavaliere, C.; Giansanti, P.; Gubbiotti, R.; Samperi, R.; Laganà, A. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *J. Chromatogr. A*. 2010. **1217**: 2521- 2532.
9. López, B.; García, J.; Molina, A. Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review. *Talanta*. 2009. **79**: 109-128.
10. Ding, Y.; You, J.; Lydy, M. Analysis of Pyrethroid Insecticides in *Chironomus dilutus* Using Matrix Solid Phase Dispersion Extraction. *Bull Environ Contamin Toxicol*. 2009. **83**: 388-392.
11. Diario Oficial de la Unión Europea. Bruselas. 2009. REGLAMENTO (UE) No 37/2010 DE LA COMISIÓN de 22 de diciembre de 2009. Disponible en: [http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg\\_2010\\_37/reg\\_2010\\_37\\_es.pdf](http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_es.pdf) [Consultado el 15 de julio de 2013]
12. Cardona, Y.; Chaparro, A.; Calderón, L.; Peláez, M.; García, C. Standardization of analytical method for extraction and quantification of cypermethrin in grass. *Rev Colomb Quím*. 2011. **40**: 211-226.
13. Albero, M. Determinación de residuos de contaminantes orgánicos en miel y zumos. Trabajo de grado, Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2009, pp 174.
14. Cheng, J.; Liu, M.; Yu, Y.; Wang, X.; Zhang, H. Ding, L. Jin, H. Determination of pyrethroids in porcine tissues by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography. *Meat Science*. 2009. **82**: 407-412.

### Article citation:

Chaparro, A. L.; Gamboa, D.P.; Cardona, Y.; Bustamante, J.J.; García, C.H. Desarrollo y validación de un método verde para la extracción y cuantificación de residuos de cipermetrina en tejido animal. *Rev Colomb Quím*. 2014. **43**(1): 25-29. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v43n1.50537>