

Determinación de residuos de paraquat en lechuga y repollo cultivados en Lepaterique mediante HPLC-DAD

Dania A. García, Meylin J. Galo¹
Heidy Velásquez, Gina L. Calderón²
Henry D. Ponce³

RESUMEN

La determinación de residuos del herbicida paraquat en lechuga (*Lactuca sativa*) y repollo (*Brassica oleracea*) producidos en la comunidad de La Brea, Lepaterique y comercializados en la ciudad de Tegucigalpa fue llevada a cabo en los meses de octubre y noviembre de 2017, mediante la aplicación de cromatografía líquida de elevada resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) en menos de 6 minutos, con un mecanismo de separación de fase reversa empleando una columna superficialmente porosa C18 y una mezcla de ácido orto fosfórico al 0.1 M (pH 3,0) con acetonitrilo en proporción de 3:1 como fase móvil. El método se basa en la extracción con baño ultrasónico utilizando agua como solvente extractor y la subsecuente aplicación de la extracción en fase sólido (SPE) con sorbente de intercambio iónico débil (WCX). Los diferentes parámetros de la extracción (solvente extractor, tiempo de sonicación, solvente de limpieza y solvente de elución) fueron evaluados para optimizar la eficiencia del proceso de extracción. La validación del método fue llevada a cabo mediante la fortificación de muestras a 0.05 y 1mg Kg⁻¹, con tres replicas (n=3) para cada concentración, determinando la linealidad, exactitud (expresada como porcentaje de recuperación), límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ). El límite de detección del método fue de 0.025 mg Kg⁻¹, el cual se encuentra por debajo del límite máximo de residuo (MRL) que establece el Codex Alimentarius (0.07 mg Kg⁻¹) para vegetales de hoja. Las muestras adquiridas fueron analizadas siguiendo el método validado, sin encontrar residuos de paraquat en un total de 10 muestras de cada vegetal.

Palabras clave: *Análisis, vegetales de hoja, MRL, HPLC-DAD, SPE, Codex Alimentarius*

¹ Estudiantes, Departamento de Control Químico, Facultad de Química y Farmacia, UNAH.

² Asesores, Departamento de Control Químico, Facultad de Química y Farmacia, UNAH.

³ Asesor, Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia.
henrypon@alumni.uv.es

ABSTRACT

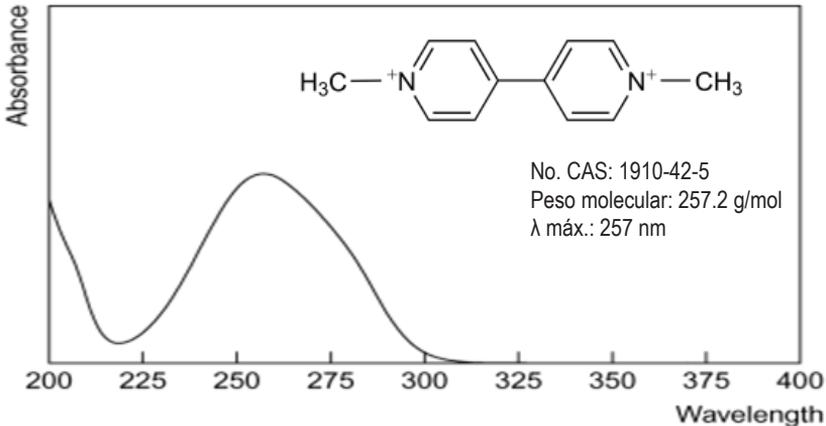
Determination of residues of the herbicide paraquat in lettuce (*Lactuca sativa*) and cabbage (*Brassica oleracea*) produced in the community of La Brea, Lepaterique and marketed in the city of Tegucigalpa was carried out in october and november of 2017, through the application of high performance liquid chromatography with detector of diode array (HPLC-DAD) in less than 6 minutes, with a reverse phase separation mechanism using a C18 surface porous column and a mixture of 0.1 M orthophosphoric acid (pH 3.0) with acetonitrile in proportion of 3:1 as mobile phase. The method is based on extraction with ultrasonic bath using water as extractive solvent and the subsequent application of solid phase extraction (SPE) with weak ion exchange (WCX) sorbent. The different parameters of the extraction (extractor solvent, sonication time, cleaning solvent and elution solvent) were evaluated to optimize the efficiency of the extraction process. Validation of the method was carried out by fortifying samples at 0.05 and 1mg Kg⁻¹, with three replicates (n = 3) for each concentration, determining linearity, accuracy (expressed as percent recovery), detection limits (LOD) and quantification (LOQ). The limit of detection of the method was 0.025 mg Kg⁻¹, which is below the maximum residue limit (MRL) established by the Codex Alimentarius (0.07 mg Kg⁻¹) for leafy vegetables. The acquired samples were analyzed following the validated method, without finding paraquat residues in a total of 10 samples of each vegetable.

Keywords: *Analysis, leafy vegetables, MRL, HPLC-DAD, SPE, Codex Alimentarius.*

INTRODUCCIÓN

El herbicida Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinio dicloruro) pertenece a la familia de los bipiridilos siendo ampliamente utilizado a nivel mundial gracias a su potente acción contra malas hierbas con la posibilidad de ser utilizado con la mayoría de los cultivos (Syngenta, 2018). Dicha acción herbicida se ve favorecida por algunas propiedades físicas que posee como ser fácil manejo, baja presión de vapor, elevada solubilidad en agua y alto potencial de unión con el suelo, lo que previene la lixiviación hacia fuentes de agua y permite su desactivación (V.Y. Taguchi, 1998). El paraquat ejerce su acción sobre los cloroplastos de las plantas verdes, específicamente sobre fotosistema I produciendo "radicales libres". Posteriormente el oxígeno transforma los radicales libres en superóxidos, mismos que generan cambios químicos destruyendo las membranas de la planta (Syngenta, 2018). La figura 1 muestra la estructura química, algunos datos de interés y espectro de absorción ultravioleta (UV) del paraquat.

Figura 1. Estructura molecular y espectro de absorción UV del Paraquat (Moffat, Osselton, & Widdop, 2005).



El amplio uso de este herbicida en la agricultura ha incrementado la preocupación de la presencia de residuos en alimentos y cultivos debido a que se ha demostrado que posee una elevada toxicidad para los seres humanos siendo capaz de producir daños a nivel local y sistémico. En el caso de la primera, la misma se produce a través del daño directo sobre el tejido de contacto, en cambio con la toxicidad sistémica es dominada por la toxicidad pulmonar, la que resulta de la absorción del compuesto por los pulmones mediante un proceso de absorción saturable, además de generar daño

secundario sobre los riñones y el hígado (I.B. Gawarammana, 2011). Asimismo, algunos estudios recientes han demostrado la relación entre la exposición crónica con paraquat al apareamiento del mal de Parkinson (A.L. McCormack, 2002). Dichas preocupaciones han derivado en la prohibición de su uso en muchos países, sin embargo, existen un centenar de países donde aún es utilizado, incluso para el año 2003 fue el segundo producto agroquímico en el listado de ventas, con ganancias que ascendieron hasta los 375 millones de dólares (Cobb & Reade, 2010).

La temática de la seguridad alimentaria se ha convertido una gran preocupación para los gobiernos y la población, enfatizado en parte por los reportes de contaminación química y microbiológica de los alimentos. En esa ruta, la preocupación de los entes encargados, para asegurar la calidad de los alimentos y regular la cantidad de residuos de plaguicidas que podrían permanecer, sin suponer ningún riesgo para los consumidores (Tayaputch, 2007). Estas normativas alimentarias internacionales se han establecido desde hace más de tres décadas con el objetivo de facilitar el comercio de los alimentos, así como resolver disputas comerciales. Se incluye en estas normativas los valores de residuos máximos (MRLs) de pesticidas en alimentos, siendo utilizados en muchos países, lo que ha hecho que otros países establezcan sus propios MRLs o lo hagan con normativas regionales para varios países. Debido a que los vegetales forman parte importante de la dieta alimenticia, actualmente la presencia de paraquat en vegetales de hoja, incluidos la lechuga y repollo, es limitada a valores de 0.02 mg Kg⁻¹ (Unión Europea), 0.05 mg Kg⁻¹ (Japón) y 0.07 mg Kg⁻¹ (FAO Codex Alimentarius) (Ministry, 2018).

Diversos métodos analíticos han sido desarrollados para la determinación de paraquat en matrices biológicas, ambientales y alimentarias, dentro de los cuales la utilización de cromatografía de gases (Khan, 1975) y cromatografía líquida (Santos, Madeira, & Alves, 2015), acopladas a Espectrometría de Masas (Osman, Al-Humaid, Al-Rehiyani, & Al-Redhaiman, 2010) (Tingting Zou, 2015) muestran mejor sensibilidad. Por otra parte, la aplicación de la cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos (DAD) (AOAC, 2005) presenta la ventaja de no requerir de instrumentación analítica costosa. En menor medida también han sido aplicados procedimientos de electroforesis capilar (Y.Y. Wigfield, 1993), inmunoensayos (M.Y. Selisker, 1995), espectrofotométricos (F. Maya, 2011) y voltamétrico (Lara Sandoval, García Colmenares, & Chaparro Acuña, 2015). La determinación de paraquat en alimentos requiere de procedimientos complejos de extracción de forma que puedan eliminarse interferencias, así como aislar y pre concentrar a los analitos para aumentar la sensibilidad del análisis. Algunos trabajos han aplicado la extracción mediante sonicación y la posterior aplicación de la extracción en fase sólida (SPE), de manera que puedan

llegarse a los límites de detección requeridos. En cuanto a la cromatografía líquida, mecanismos de fase reversa, par iónico e interacción hidrofílica la tabla 1 muestra un resumen de los trabajos desarrollados para la determinación de paraquat encontrados en la literatura para diferentes matrices.

Tabla 1. Resumen de métodos analíticos para la determinación de paraquat en diversas matrices.

Técnica analítica empleada	Muestra analizada	Características del método	Referencia
Cromatografía líquida de elevada resolución con detector DAD	Aguas	Técnica de tratamiento de muestra: Extracción en fase sólida (SPE); Columna: Monolítica C18, 3 X 4.6 mm; Fase móvil: Ácido heptafluorobutírico 10 mM: Acetonitrilo (95:5); Flujo: 1 mL min ⁻¹ ; Detector: 259 nm	(Santos, Madeira, & Alves, 2015)
Cromatografía líquida de elevada resolución con detector DAD	Plasma humano	Técnica de tratamiento de muestra: Extracción líquido-líquido (LLE); Columna: C18, 150 X 4.6 mm, 5 µm, a 35°C; Fase móvil: Ácido orto fosfórico 0.1 M: Acetonitrilo con SDS (85:15); Flujo: 1 mL min ⁻¹ ; Detector: 256 nm	(Zou, y otros, 2011)
Cromatografía líquida de elevada resolución con detector DAD	Plasma humano	Técnica de tratamiento de muestra: Extracción líquido-líquido (LLE); Columna: C18, 250 X 4.6 mm, 5 µm, a 28°C; Fase móvil: Tampón de fosfato 0.1 M: Acetonitrilo con SDS (88:12); Flujo: 1 mL min ⁻¹ ; Detector: 258 nm	(Sun & Chen, 2015)
Cromatografía líquida de elevada resolución con detector DAD	Patatas	Técnica de tratamiento de muestra: Extracción en fase sólida (SPE); Columna: Estirendivinilbenceno, 300 X 7 mm, 10 µm; Fase móvil: 13.5 mL Ácido fosfórico/ 10.3mL dietilamina/ 3.0 g heptensulfonato de sodio / 1 L agua; Flujo: 3mL min ⁻¹ ; Detector: 254 y 313 nm	(AOAC, 2005)
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	Tomate/Lechuga/ Pepino/Zanahoria	Técnica de tratamiento de muestra: Extracción en fase sólida (SPE); Columna: CP-Sil 30 m x 0.25 mm; Fase móvil: Helio 1mL min ⁻¹ ; Temperatura: 50° por 2 min, rampa 20°/min hasta 160° por 2 min, rampa 3°/min hasta 300° por 1 min. Detector: Modo SIM 70eV, transfer 280°C	(Osman, Al-Humaid, Al-Rehiyani, & Al-Redhaiman, 2010)
Voltametría	Patatas	Técnica de tratamiento de muestra: Soxhlet; Aparato: Voltamperometría con electrodo de carbón vítreo	(Lara Sandoval, García Colmenares, & Chaparro Acuña, 2015)
Cromatografía líquida de elevada resolución acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)	Lechuga/Espinaca/ Coliflor	Técnica de tratamiento de muestra: Sonicación-Extracción en fase sólida (USE/SPE); Columna: HILIC 100 x 2.1 mm, 3 µm; Fase móvil: 10mM Acetato amonio-1% Ac. Fórmico - Acetonitrilo Flujo: 0.2 mL min ⁻¹ ; Temperatura: 30°C Detector: MRM modo positivo	(Tingting Zou, 2015)
Cromatografía líquida de elevada resolución acoplada a espectrometría de masas/masas (ULC-MS/MS)	Caupí (Frijol chino)	Técnica de tratamiento de muestra: Extracción líquido-líquido (LLE); Columna: Obelisc R, 150 X 2.1 mm, 5 µm, a 40°C; Fase móvil: Formato de amonio 20 mM acidificado (pH=3) con ácido fórmico y acetonitrilo; Flujo: 0.4 mL min ⁻¹ ; Detector: MRM modo positivo.	(I.R. Pizzutti, 2016)

Un aspecto importante en el desarrollo de métodos analíticos involucra la posterior validación del procedimiento establecido, para lo cual la norma SANCO/12571/2013 (EU Reference Laboratories, 2018), establece el control de calidad y procedimientos de validación para el análisis de residuos de pesticidas en alimentos y piensos.

Como se ha podido constatar, Zou y colaboradores (Zou, He, Cao, & Li, 2015) determinaron la presencia de paraquat en vegetales de hoja, haciendo uso de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem, sin embargo, en el presente trabajo se desarrollará un método para este tipo de vegetales, empleando un detector DAD debido a las limitaciones de contar con equipamiento de elevado coste, aplicando la extracción con baño ultrasónico y posterior SPE con cartuchos con sorbente de intercambio iónico débil (WCX). El objetivo del estudio es determinar la presencia de residuos de paraquat en muestras de lechuga y repollo producidas en el municipio de Lepaterique, zona productora de la mayoría de los vegetales que se consumen en el Distrito Central (Blanco, Calderón, Lanza, Velásquez, & Ponce, 2016) y comercializadas en la ciudad de Tegucigalpa, estableciendo si las concentraciones no exceden los MRL establecidos por el Codex Alimentarius, de modo que la presencia de este compuesto no represente un riesgo para la salud de la población que consume estos alimentos.

METODOLOGÍA

Diseño

El estudio se rige por un diseño no experimental de tipo transeccional, determinado la presencia del herbicida en las muestras de lechuga y repollo sin la manipulación de variable, en un solo momento, aplicando para ello el método analítico desarrollado en el laboratorio.

Población y muestra

En la investigación se estableció como puntos de muestreo la aldea La Brea, municipio de Lepaterique siendo el lugar donde se cultivan estos vegetales, y en la feria del Agricultor y Artesano, ubicada en las inmediaciones del Estadio Nacional de Tegucigalpa en donde son comercializados los vegetales producidos en dicha comunidad. Debido a la imposibilidad de los investigadores de conocer el número exacto de la población de vegetales en los puntos de muestreo se decidió aplicar un muestreo no

probabilístico (Hernández Sampieri, Fernandez Collado, & Baptista Lucio, 2010), adquiriendo en cada punto cinco muestras de cada vegetal, bajo el criterio que fueran vegetales producidos en la comunidad de La Brea y las muestras obtenidas en la feria del Agricultor y Artesano provinieran de dicha zona geográfica. Una vez obtenidas las muestras fueron rotuladas y almacenadas, siendo un total de 10 muestras de lechuga y mismo número de muestras de repollo.

Entorno

Los análisis fueron realizados en el laboratorio de investigación de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia ubicada en UNAH-CU.

Intervenciones

Reactivos: Acetonitrilo y metanol calidad HPLC de la marca J.T. Baker fueron utilizados. Ácido orto fosfórico y ácido trifluoroacético grado reactivo de la marca Merck se adquirieron del almacén de reactivos de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Estándar y soluciones: El estándar de paraquat empleado se adquirió de Sigma Aldrich USA con un 99.9% de pureza. Se preparó una solución estándar de 1 mg mL⁻¹, pesando para ello 25mg del patrón y aforando en matraz volumétrico de 25 mL con agua calidad HPLC. Una solución de trabajo de 10 mg L⁻¹ fue preparada a partir de la solución estándar midiendo 0.1 mL y aforando en matraz volumétrico de 10 mL, aforado con agua calidad HPLC. Para la obtención de la linealidad instrumental se prepararon diluciones de 10 a 0.5 mg L⁻¹ a partir de la solución de trabajo midiendo volúmenes de 1.0; 0.8; 0.5; 0.25; 0.1 y 0.05 mL y aforando cada una ellas en matraz volumétrico de 10 mL con la fase móvil. Estas soluciones fueron almacenadas en congelación hasta su uso. Una solución de ácido orto fosfórico 0.1 M fue preparada en matraz volumétrico de 1 L. La fase móvil empleada consistió en una mezcla de la solución de ácido orto fosfórico al 0.1 M (pH 3) con acetonitrilo, en proporción de 3:1.

Instrumentación: Para el desarrollo del método se utilizó un baño ultrasónico marca Branson, modelo CPX2800; agitador mecánico de la marca KoolLab, modelo KS-VM-1000, centrifuga marca LW Scientific, modelo C5. Agua calidad HPLC fue obtenida con equipo purificador de la marca Thermo Scientific, modelo Barnstead micropure st. El pesaje de estándar, reactivos y muestras se realizó en balanza analítica OAHUS modelo Explorer Pro. Cámara de extracción en fase sólida fue utilizada de la marca Agilent, modelo VacElut 20, siendo los cartuchos empleados de la marca

Thermo HyperSep WCX. Una bomba al vacío de la marca Millipore, modelo WP6111560 se empleó durante los experimentos. La separación cromatográfica se efectuó en un cromatógrafo líquido marca Shimadzu, modelo Prominence, consistiendo en una bomba modelo LC20-AT, un sistema de control CMB-20Alite, un inyector automático SIL-20A, un horno de columna CTO-A20 y un detector SPD-M20A. Se utilizó el software EZ Start versión 7.4 para recolectar y procesar los datos obtenidos. En el desarrollo de las condiciones cromatográficas se utilizaron dos columnas cromatográficas, columna convencional Alltima C18 de 150 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno con un tamaño de partícula de 5 μm , y columna superficialmente porosa C18 de 100 mm por 4.6 mm con partículas de 2,6 μm . El volumen de flujo de la fase móvil fue de 1 mL min⁻¹, y el volumen de inyección se fijó en 50 μL de las soluciones del estándar y las muestras. El detector de arreglo de diodos se controló a una longitud de onda de 256 nm.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los experimentos del desarrollo y validación del método propuesto fueron procesados utilizando hojas de cálculo de Microsoft Excel 2010, además del software del instrumento. Siguiendo las recomendaciones para la evaluación del desempeño del método de la norma SANCO/12571/2013 se aplicaron diferentes pruebas estadísticas. En el caso de límite de detección, definido como la concentración con intensidad de señal del analito mayor de tres veces del ruido, es decir la relación señal-ruido (s/n), y límite de cuantificación, relación señal-ruido mayor a 10, muestras de lechuga fueron fortificadas con cantidad de herbicida a partir de la solución de trabajo. La evaluación de la repetibilidad del método, por medio del análisis de tres muestras de vegetal fortificado a una concentración de 0.05 mg kg⁻¹ para determinar su concentración y con estos valores se efectuaron cálculos estadísticos para determinar los coeficientes de variación. La recuperación fue evaluada a dos niveles de concentración, 0.05 mg kg⁻¹ y 1 mg kg⁻¹, analizando tres muestras de vegetal fortificado para obtener el porcentaje de recuperación y su respectiva desviación estándar.

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Separación cromatográfica

La literatura de métodos para la determinación de paraquat mediante cromatografía

líquida reporta la utilización de fases móviles acuosas, conteniendo solventes orgánicos como metanol, acetonitrilo y en algunos casos pares iónicos. La utilización de acetonitrilo, de menor viscosidad que el metanol, disminuye la presión en la columna, pese a que presenta un mayor costo relativo que el último. Sin embargo, el acetonitrilo posee una banda de absorción por debajo de los 195 nm, con lo cual no interfiere en el espectro de absorción de los picos obtenidos. Al igual que en otros trabajos, la utilización de solución de ácido orto fosfórico al 0.1 M con un pH de 3.0 y como solvente orgánico acetonitrilo en proporción de 3:1 demostró ser la fase móvil adecuada para la separación de Paraquat sin la interferencia de componentes endógenos de la matriz.

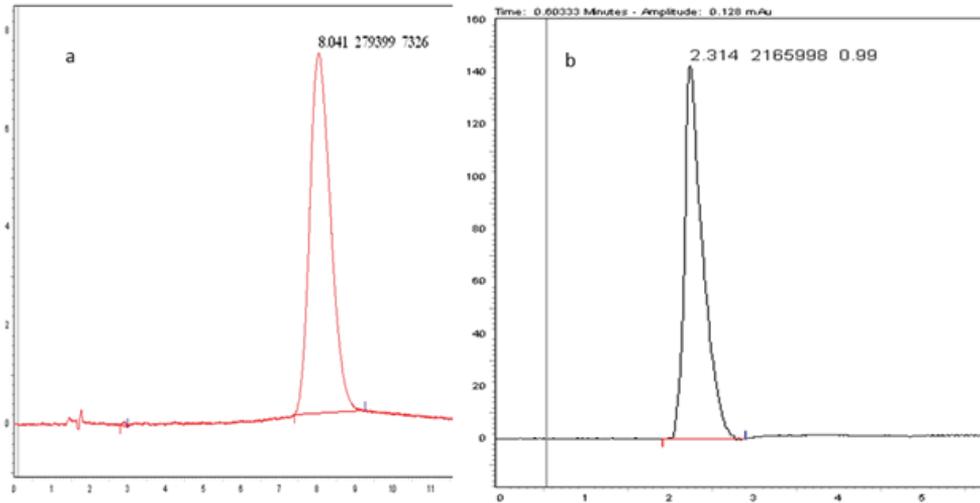
Con relación a la columna analítica, se efectuaron pruebas con una columna convencional de 150 mm de longitud y un tamaño de partícula de 5 μm , con la que se obtuvo una correcta separación, utilizando un volumen de flujo de 1.5 mL min^{-1} apareciendo el pico de interés a un tiempo de 8 minutos. Por otra parte, los resultados con la columna superficialmente porosa con un tamaño de partícula de 2.6 μm mostraron el pico del analito antes de los tres minutos, además de una disminución del volumen de flujo fijado en 1 mL min^{-1} . Esto se explica debido a que la segunda columna muestra mejores separaciones que las convencionales, reduciendo la difusión del analito en la columna sin incrementar la presión con eficiencias similares a las columnas UHPLC, con la ventaja de no necesitar equipamiento especial como es el caso de las columnas UHPLC. Asimismo, las columnas superficialmente porosas disminuyen el gasto de solvente al poder trabajar con menores volúmenes de flujo. La figura 2 muestra los cromatogramas obtenidos con ambas columnas donde puede observarse los mejores resultados de la columna superficialmente porosa.

El resto de las condiciones cromatográficas establecidas fueron trabajar a temperatura ambiente a una longitud de onda de 256 nm, banda de absorción máxima en la región ultravioleta que señala la literatura para el paraquat, y con un volumen de inyección de 50 μL para las soluciones del estándar y la muestra.

Extracción de la muestra

La extracción ultrasónica, conocida también como sonicación, hace uso de vibraciones ultrasónicas las cuales permiten el contacto cercano del solvente extractor con las partículas de la muestra que contiene los analitos de interés (Mitra, 2003). Pese a ser una técnica de tratamiento rápida presenta la desventaja de no ser exhaustiva, es decir que posee una baja eficiencia en comparación a otras técnicas para muestras sólidas. La selección del solvente de extracción es el aspecto de mayor impacto a

Figura 2. a. Cromatograma obtenido con la columna convencional; b. Cromatograma obtenido con la columna superficialmente porosa.



Fuente: Cromatógrafo líquido Shimadzu.

decidir en este tipo de técnica, para lo cual algunos trabajos para la determinación de paraquat han empleado soluciones fuertes de ácido clorhídrico o sulfúrico, sin embargo, la utilización de estas soluciones implicaría efectuar una etapa adicional de neutralización posterior ya que estas soluciones causarían hidrólisis al sorbente de sílica utilizado en la purificación del extracto.

En base a la elevada solubilidad del herbicida en agua, se decidió realizar las extracciones con este solvente, de manera que se optimice el tiempo de sonicación necesario, para lo cual una muestra de lechuga, previamente lavada se trituró y homogenizó mediante un procesador de alimentos para pesar tres muestras individuales de 10 gramos de lechuga, las cuales fueron colocadas en tubo plástico de centrifuga de 50 mL de capacidad. Posteriormente, las muestras fueron fortificadas con paraquat y colocadas en el vortex por 30 segundos para posteriormente dejar reposar por 5 minutos. La concentración de estas muestras fue de 0.5 mg kg⁻¹.

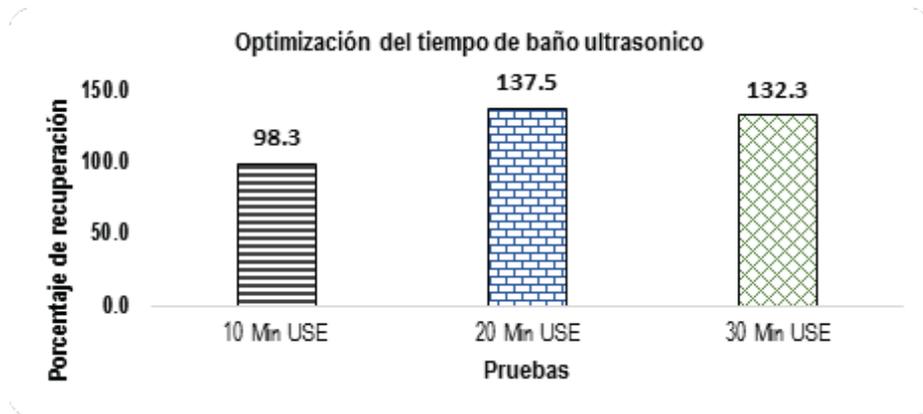
A cada una de las muestras se les agregaron 15 mL de agua y se coloca en agitación vortex por 30 segundos para después aplicar la extracción con baño ultrasónico a tres tiempos diferentes, 10, 20 y 30 minutos. Transcurrido el tiempo para cada muestra, se colocan en centrifugación durante 10 minutos a 5000 revoluciones por minuto (rpm). Estas soluciones fueron analizadas en el cromatógrafo para determinar los valores de

recuperación, observándose que el mejor valor se presentó con 10 minutos de sonicación, ya que las muestras restantes, presentaron valores por encima de 130%, lo que denota un efecto matriz de enriquecimiento del analito con interferencias presentes en la muestra, como se visualiza en la figura 3. Finalmente, se procedió a optimizar el tiempo de centrifugación necesario para alcanzar adecuadas recuperaciones, para ello dos muestras fortificadas fueron evaluadas con 5 y 10 minutos de centrifugación. Observándose mejores resultados cuando se aplican 10 minutos ya que permite la sedimentación total del material vegetal.

Purificación del extracto de la muestra

Debido a que el sobrenadante obtenido de la extracción contiene diversas impurezas procedentes de la matriz que afectan la selectividad y sensibilidad del análisis, lo mismo que dificulta la correcta cuantificación del analito, ya que la co-elución de dichas impurezas con el herbicida incrementa las señales obtenidas teniendo un efecto matriz de enriquecimiento, la aplicación de la SPE es necesaria para lograr una mejor purificación del extracto previo al análisis cromatográfico, así como para disminuir los límites de detección precisados para este tipo de determinación.

Figura 3. Recuperación de analito en función del tiempo de sonicación.



Fuente: Elaboración propia

Actualmente existe una gama de sorbentes que pueden utilizarse para la SPE, variando generalmente de acuerdo con su polaridad, siendo este el principal aspecto a tomar en cuenta para su selección por su influencia directa en la selectividad, capacidad de absorción y el formato de configuración (J. Plotka-Wasyłka, 2017). En ese sentido, debido a que la molécula de paraquat puede encontrarse en su forma catiónica

ca, es preciso emplear sorbentes que actúen con mecanismos de intercambio catiónico, tal es el caso del sorbente de WCX, mismo que contiene ácido carboxílico (Thermo Fisher, 2018), lo que favorece la retención de especies cargadas positivamente. En el proceso de la SPE, las etapas de limpieza y elución deben ser optimizadas de manera que puedan eliminarse la mayor cantidad de impurezas sin que esto conlleve a la pérdida o no elución del analito. En el caso de la primera, se efectuaron dos pruebas empleando 1 mL de agua destilada y 1 mL de una mezcla de agua-metanol (50:50), encontrándose una baja recuperación cuando se utilizó agua debido a que este solvente elimina las moléculas de paraquat retenidas en el sorbente. En cambio, la mezcla de metanol y agua logra reducir las impurezas sin eluir las moléculas de paraquat retenidas en el sorbente. Por otra parte, para la etapa de elución fueron evaluadas dos mezclas de solventes, 1 mL de acetonitrilo-agua (50:50) y 1 mL de acetonitrilo-agua-ácido trifluoroacético en proporción de 80:18:2, observándose que la adición de ácido trifluoroacético mejora la elución de paraquat lo que puede explicarse por un efecto de acidificación del medio al ser un ácido fuerte, disminuyendo la retención del paraquat en el sorbente, volviéndolo más afin al eluyente. Finalmente, el volumen eluido es evaporado a sequedad empleando nitrógeno gaseoso y una temperatura de 50°C para ser redisolto con 1 mL de la fase móvil.

Desempeño del método analítico

De acuerdo con la guía SANCO los parámetros de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, repetibilidad, recuperación y selectividad fueron evaluados. Con relación a la linealidad de curvas analíticas la curva de calibración preparada con las señales obtenidas de las soluciones estándar diluidas en la fase móvil mostró un coeficiente de determinación (r^2) igual a 0.9961. Asimismo, una curva de calibración fue preparada fortificando el extracto de muestras blanco de lechuga con igual concentración del analito, obteniendo un valor r^2 de 0,983. El límite de detección de Paraquat se estableció en 0.025 mg kg⁻¹, encontrándose dicha concentración por debajo del valor MRL establecido, y en el caso del límite de cuantificación se estableció en la concentración de 0.05 mg kg⁻¹. La tabla 2 muestra el resumen de los resultados alcanzados para la verificación del método, incluyendo la repetibilidad del método y la recuperación. Para el caso de la primera, un coeficiente de variación menor a 15% fue encontrado y los valores de recuperación observados fueron satisfactorios para los niveles de concentración estudiados. Finalmente, la selectividad del método fue evacuada mediante la pureza de pico cromatográfico, comparando el espectro de absorción del estándar con el espectro de absorción teórico del paraquat.

Tabla 2. Resultados de validación de parámetros del método analítico.

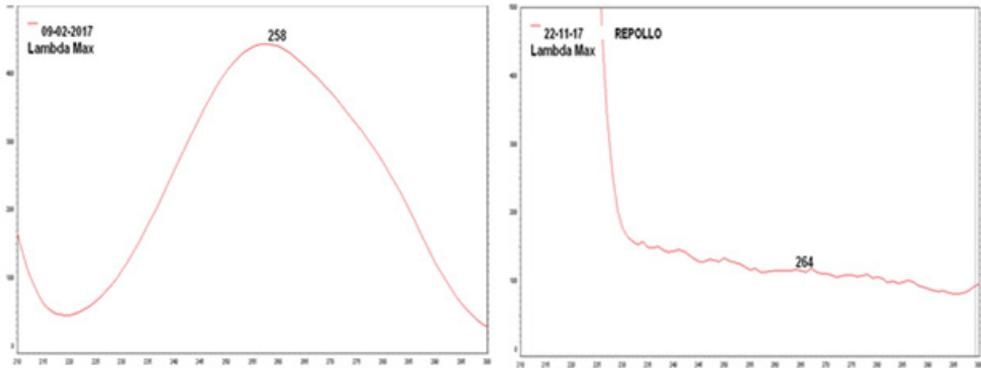
Parámetro	Paraquat
<i>Rango lineal (mg Kg⁻¹)</i>	0.05 - 1.0
<i>Pendiente</i>	28820
<i>Intercepto</i>	26351
<i>Coefficiente de correlación (r)</i>	0.991
<i>Coefficiente de determinación (r²)</i>	0.983
<i>Límite de detección mg Kg⁻¹</i>	0.025
<i>Límite de cuantificación mg Kg⁻¹</i>	0.05
<i>Precisión (coeficiente de variación)</i>	
<i>Repetibilidad (n = 3)</i>	11.9
<i>Exactitud (% de recuperación ± desviación estándar) (n = 3)</i>	
<i>0.05 mg Kg⁻¹</i>	60.7 (± 13.2)
<i>1 mg Kg⁻¹</i>	71.8 (± 12.0)

Fuente: Elaboración propia

Análisis de muestras obtenidas

Las muestras de lechuga y repollo fueron analizadas empleando el método analítico desarrollado, para lo cual se trabajó con muestras compuestas, tomando las cinco unidades de cada vegetal de los dos sitios muestreados y procediendo a triturar y homogenizar. En total se obtuvieron dos muestras de lechuga y dos muestras de repollo. De estas muestras compuestas se pesaron tres sub-muestras de 10 gramos cada una, tres de la lechuga obtenida en La Brea y tres de la feria del Agricultor y Artesano; otras seis muestras de repollo, tres por cada punto de muestreo fueron también pesadas, siendo en total 12 muestras analíticas. Cada una de estas muestras fueron analizadas de forma duplicada, siendo un total de veinticuatro inyecciones en el instrumento. Los cromatogramas de las muestras analizadas presentaron algunos picos cromatográficos cercanos al tiempo de retención del analito, sin embargo, al comparar los espectros de absorción resultantes con el espectro de absorción obtenido de muestras fortificadas con el estándar de paraquat, los mismos no mostraron coincidencia entre las bandas de máxima absorción, lo mismo que en la forma del espectro (Figura 4). Por ello es posible asegurar la ausencia de Paraquat en las muestras de lechuga y repollo de los dos puntos muestreados.

Figura 4. Comparación de espectros de absorción del análisis de las muestras de vegetales y muestras fortificadas con el estándar.



Fuente: Cromatógrafo líquido Shimadzu.

CONCLUSIONES

El método analítico desarrollado, empleando la extracción con agua mediante sonicación y posteriormente la purificación del extracto haciendo uso de SPE con sorbente de intercambio catiónico débil, para finalmente llevar a cabo una separación en fase reversa logro determinar la concentración de paraquat en un rango de concentraciones que incluye las concentraciones de residuos máximas permitidas por el Codex Alimentarius. El método demostró una adecuada recuperación con correctos valores de repetibilidad, siendo aplicado al análisis de muestras de lechuga y repollo producidas en la comunidad de La Brea y comercializadas en la ciudad de Tegucigalpa. Ninguna de las muestras analizadas presentó presencia de paraquat dentro del rango de concentraciones evaluadas sin que excedan las concentraciones establecidas como seguras para el consumo humano, no existiendo riesgo de consumo de paraquat en los vegetales estudiados por parte de la población hondureña.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Investigación Científica y Posgrado (DICyP) de la UNAH por el apoyo financiero mediante beca de investigación estudiantes de grado 04-2016. A las autoridades de la Facultad de Química y Farmacia por el apoyo logístico a la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.L. McCormack, M. T.-B.-S. (julio de 2002). Environmental risk factors and Parkinson's disease: Selective degeneration of Nigral Dopaminergic Neurons Caused by the Herbicide Paraquat. *Neurobiol. Dis.*, 10(119), 119-127. doi:10.1006/nbdi.2002.0507
- AOAC, 2. O. (2005). *Diquat and Paraquat Residues in potatoes*. Maryland. Recuperado de: <http://www.eoma.aoc.org/>.
- Blanco, A., Calderón, G., Lanza, N., Velásquez, H., & Ponce, H. (2016). Actividad de la colinesterasa total en pobladores que utilizan plaguicidas en La Brea, Lepaterique durante el año 2015. *Revista Ciencia y Tecnología*, 94-110.
- Cobb, A., & Reade, J. (2010). Herbicide Discovery and Development. En A. Cobb, J. Reade, A. Cobb, & J. Reade (Edits.), *Herbicides and Plant Physiology* (págs. 27-49). Newport, UK: Wiley Online Library.
- EU Reference Laboratories, f. R. (20 de Noviembre de 2018). *EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides*. Recuperado el 1 de Febrero de 2018, de EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides: <http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl/article.asp?CntID=727&LabID=100&Lang=EN>
- F. Maya, J. E. (Julio de 2011). Improved spectrophotometric determination of paraquat in drinking waters exploiting a Multisyringe liquid core waveguide system. *Talanta*, 85(588), 588-595. doi:10.1016/j.talanta.2011.04.022
- Hernández Sampieri, R., Fernandez Collado, C., & Baptista Lucio, P. (2010). *Metodología de la Investigación*. México: McGraw Hill.
- I.B. Gawarammana, N. B. (Noviembre de 2011). Medical management of paraquat ingestion. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 72(745), 745-757. doi:10.1111/j.1365-2125.2011.04026.x
- I.R. Pizzutti, G. V. (Octubre de 2016). Determination of paraquat and diquat: LC-MS method optimization and Validation. *Food Chemistry*, 209(248), 248-255. doi:10.1016/j.foodchem.2016.04.069
- J. Plotka-Wasyłka, M. M. (Abril de 2017). New Polymeric Materials for Solid Phase Extraction. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 47(373), 373-383. doi:doi.org/10.1080/10408347.2017.1298987
- Khan, S. (Diciembre de 1975). Determination of paraquat residues in food crops by gas chromatography. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 14(745), 745-749. doi:10.1007/BF01685252
- Lara Sandoval, A., García Colmenares, J., & Chaparro Acuña, S. (2015). Validación del método voltamétrico para la determinación de residuos de paraquat aplicado en cultivos de papa. *Acta Agron.*, 64(4), 336-341.
- M.Y. Selisker, D. H. (Febrero de 1995). Determination of Paraquat in Fruits and Vegetables By a Magnetic Particle Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Agric. Food Chem.*, 43(544), 544-547. doi:10.1021/jf00050a053
- Ministry, f. P. (20 de Noviembre de 2018). *Growing and protecting New Zealand*.
- Mitra, S. (2003). *Sample preparation techniques in analytical Chemistry*. New Jersey: Wiley.

- Moffat, A. C., Osselton, M. D., & Widdop, B. (2005). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Londres: Pharmaceutical Press.
- Osman, K., Al-Humaid, A., Al-Rehiyani, S., & Al-Redhaiman, K. (Junio de 2010). Monitoring of pesticide residues in vegetables marketed in Al-Qassim region, Saudi Arabia. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 73, 1433-1439.
- Santos, M., Madeira, L., & Alves, A. (Mayo de 2015). Different Approaches for Paraquat Quantification in Waters. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38, 472-484.
- Sun, B., & Chen, Y. (Octubre de 2015). A simple and rapid method for detection of paraquat in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Int J Clin Exp Med*, 8(10), 17067-17071.
- Syngenta, C. P. (20 de Noviembre de 2018). *Centro de información sobre paraquat*. Recuperado de: <http://paraquat.com/es/beneficios/beneficios-para-la-agricultura>
- Tayaputch, N. (2007). Harmonization of ASEAN MRLs, the Work towards Food Safety and Trade Benefit. En H. Ohkawa, H. Miyagawa, P. Lee, H. Ohkawa, H. Miyagawa, & P. Lee (Edits.), *Pesticide Chemistry. Crop Protection, Public Health, Environmental Safety* (págs. 341-348). Weinheim: Wiley-VCH.
- Thermo Fisher, S. (20 de Noviembre de 2018). *Thermo Fisher Scientific*. Recuperado de: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/60107-301>
- Tingting Zou, P. H. (Febrero de 2015). Determination of Paraquat in Vegetables Using HPLC-MS-MS. *Journal of Chromatographic Science*, 53(204), 204-209. doi:doi.org/10.1093/chromsci/bmu041
- V.Y. Taguchi, S. J. (Agosto de 1998). Determination of Diquat and Paraquat in Water by Liquid Chromatography (Electrospray Ionization) Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 9(830), 830-839. doi. Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(98\)00043-9](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(98)00043-9)
- Y.Y. Wigfield, K. M. (Diciembre de 1993). Simultaneous determination of residues of paraquat and diquat in potatoes using high-performance capillary electrophoresis with a ultraviolet detection. *J. Agric. Food Chem.*, 41(2315), 2315-2318. doi:10.1021/jf00036a018
- Zou, T., He, P., Cao, J., & Li, Z. (2015). Determination of Paraquat in Vegetables Using HPLC - MS-MS. *Journal of Chromatographic Science*, 53.
- Zou, Y., Shi, Y., Bai, Y., Tang, J., Chen, Y., & Wang, L. (Mayo de 2011). An improved approach for extraction and high-performance liquid chromatography analysis of paraquat in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 879, 1809-1812.