

# Desarrollo de un método multirresiduo para la evaluación en leche cruda de residuos de organofosforados y piretroides aplicados comúnmente en ganadería

Development of a multiresidue method for the evaluation in raw milk of organophosphorus and pyrethroids residues commonly applied in livestock production

RECIBIDO: 19/10/2018 → APROBADO: 11/12/2018 ✉ heinzen@fq.edu.uy

✉ GÉREZ GARCÍA, NATALIA (1); BERTÓN PASSARINO, ANALÍA (1); GIL BORBA, GUILLERMO (1); CESIO, MARÍA VERÓNICA (1, 2); HEINZEN, HORACIO (1, 2)

(1) GRUPO DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS TRAZA (GACT), DQO, FACULTAD DE QUÍMICA, UDELAR, MONTEVIDEO, URUGUAY.

(2) GRUPO DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS TRAZA (GACT), DQL, CENUR LITORAL NORTE, UDELAR, PAYSANDÚ, URUGUAY.

## RESUMEN

Dentro de los ectoparasiticidas utilizados en producciones ganaderas, en las que los animales y los procesos industriales generan productos para consumo humano, como la lechería, existen diferentes combinaciones de pesticidas y acaricidas. Si no se administran adecuadamente y no se respetan los compases de espera, se pueden encontrar sus residuos en los alimentos, por ejemplo, en los productos lácteos. Este fenómeno representa un potencial peligro para los consumidores, por lo que es necesario generar herramientas que permitan determinar cómo afectan las diferentes formas de uso en las concentraciones de pesticidas a los alimentos y los intervalos que aseguren su inocuidad al consumirlos. El objetivo de este trabajo fue ajustar y validar una metodología multirresiduo de análisis en leche vacuna cruda para al determinacion de los ectoparasiticidas más empleados en ganadería utilizando GC-QqQ-MS, método elegido por su selectividad y especificidad. La preparación de muestra se basó en la metodología oficial para el análisis de residuos de pesticidas en alimentos en los EE.UU.: QuEChERS, AOAC 2007.01 (AOAC International, 2016). Se validó la metodología según el documento SANTE vigente, evaluando veracidad, precisión, linealidad, efecto matriz y límites de cuantificación (European Commission. Directorate General for Health and Food Safety, 2017). Esta metodología es

una herramienta útil para determinar curvas de decaimiento de los compuestos aplicados de manera de asegurar la calidad e inocuidad de la leche vacuna cruda.

**PALABRAS CLAVE:** *Pour-on*, residuos de pesticidas en leche cruda, GC-MS/MS, validación de metodología.

## ABSTRACT

Among the ectoparasiticides used in livestock production, where animals and industrial processes generate products for human consumption such as dairy products, there are different combinations of pesticides and acaricides. If they are not properly administered and the holding period is not respected, their residues can be present in foods, such as dairy products. This phenomenon represents a potential danger for consumers, so it is necessary to generate tools that allow to determine exactly how different forms of use affect the concentrations of pesticide residues in food and also know the holding period that ensure its innocuity when consumed. The aim of this work was to adjust and validate a methodology of analysis in raw milk for the most used compounds in livestock using GC-QqQ-MS, which is the method of choice for its selectivity and specificity. The sample preparation was based on the official methodology for the analysis of pesticide residues in food in the US: QuEChERS, AOAC 2007.01 (AOAC International, 2016). The figures of merit were evaluated according to the SANTE guidelines (European Commission. Directorate General for Health and Food Safety, 2017). This validated methodology is a useful tool to determine the decay curves of the compounds applied in order to assure the food safety.

**KEYWORDS:** *Pour-on*, pesticides in raw milk, GC-MS/MS, method validation.

## INTRODUCCIÓN

La eliminación de xenobióticos en mamíferos se realiza a través de los fluidos que el organismo excreta. Si bien las vías usuales de eliminación son la orina y las heces, otros fluidos que se producen en gran cantidad, como la leche en períodos de amamantamiento de la cría, se tornan relevantes. En particular, la leche vacuna es un alimento producido a escala industrial y altamente consumido por la población. Para mantener la productividad de los animales es crítico preservar su bienestar y salud. En ese marco, el uso de medicamentos veterinarios es una práctica corriente.

En particular, para evitar los problemas de estrés que genera la mosca de los cuernos, es común el uso de ectoparasiticidas tipo *pour-on*. Estos contienen insecticidas que luego de ser absorbidos se distribuyen sistémicamente y pueden alcanzar la leche de las vacas productoras. Este fenómeno obliga al establecimiento de períodos de espera en los que la leche obtenida no puede ser consumida porque contiene altos niveles de esos compuestos.

Debido a su contenido en grasas relativamente alto, la leche es un vehículo para la eliminación de contaminantes lipofílicos y ha sido empleada para monitorear la

bioconcentración de contaminantes orgánicos persistentes, tales como los pesticidas organoclorados (González-Rodríguez, et al., 2005), ya que está comprobado que estos se acumulan en los tejidos adiposos y son excretados en asociación con la porción grasa de la leche (Trujillo-Parra, et al., 2003).

Otros pesticidas lipofílicos pero menos persistentes o estables, como por ejemplo los organofosforados, también han sido encontrados en leches de diversos orígenes, como la leche procesada de origen animal o leche materna sin procesar.

Si bien una de las vías de contaminación de la leche vacuna puede deberse al uso de drogas veterinarias, las razones para la contaminación pueden ser de diversa índole, como por ejemplo tratamientos higiénicos contra insectos en plantas de procesamiento de leches, consumo de productos alimenticios que contengan pesticidas o uso de raciones para animales que contienen materiales vegetales tratados durante la temporada de cultivo con pesticidas, entre otros. Debido a que los pesticidas son compuestos orgánicos peligrosos, la determinación de sus residuos en alimentos como la leche es importante por el riesgo que suponen para la salud humana. A tales efectos, las principales agencias reguladoras han fijado límites máximos de residuos (LMRs) que sirven para asegurar la inocuidad de su consumo (Codex Alimentarius, 2018). Dado que los principales consumidores de leche son los niños y bebés, los límites para estas franjas etarias son mucho más estrictos. Esto obliga a emplear métodos analíticos con una capacidad de detección hasta niveles de concentración mucho menores que los alcanzados por los métodos analíticos empleados habitualmente.

La determinación de residuos de pesticidas en leche cruda presenta problemas por tratarse de una matriz compleja con alto contenido graso y proteico que forma una emulsión O/W. Para su determinación en esta matriz compleja se han desarrollado diversos métodos (Souza, et al., 2016).

Los métodos reportados para determinar residuos de pesticidas en leche están basados en extracciones líquido-líquido, como el método de Luke, que emplea acetona, el método SweEt, que utiliza Acetato de Etilo como solvente de extracción, y el de QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe), cuyo solvente extractor es acetonitrilo, así como otros métodos que involucran extracción en fase sólida, como el de Dispersión de la Matriz en Fase Sólida (MSPD). Desde hace 15 años, el análisis de residuos de pesticidas está dominado por los conceptos de miniaturización y economía en el uso de reactivos con el objetivo de cumplir con los parámetros de la química verde. Para acompañar las necesidades actuales se deben emplear técnicas de alta sensibilidad como la espectrometría de masas en tándem. Dentro de los métodos descritos, el de QuEChERS es el más empleado para el análisis multiresiduos de pesticidas en alimentos y productos agrarios, ya que permite obtener altas recuperaciones, resultados precisos, rapidez de tratamiento, poco uso de solvente y material de vidrio. Además, requiere poco espacio de laboratorio y bajo consumo de reactivos (Anastasiades, et al., 2003). Asimismo, el proceso es robusto y confiable y consta de dos etapas: extracción y clean-up. La etapa de extracción utiliza acetonitrilo (MeCN) y sulfato de magnesio anhidro (MgSO<sub>4</sub>), lo cual mejora las recuperaciones al facilitar la partición de los pesticidas en la capa orgánica gracias a que retiene el agua. En el caso de la leche, la alta fuerza iónica

que se genera ayuda a la precipitación de las proteínas. El método QuEChERS original no ajusta el pH de extracción (Anastassiades. et al., 2003), por lo que aquellos analitos lábiles a un pH elevado no serán recuperados adecuadamente (70-120%), según lo estipulado por el documento SANTE (European Commission. Directorate General for Health and Food Safety, 2017).

El utilizar el método QuEChERS AOAC 2007.01 (Lehotay, et al., 2005) permitió ampliar el número de analitos determinados en él, ya que la presencia del buffer acético-acetato formado *in situ* en el solvente de extracción hace que aquellos analitos que no se recuperaban en el método original sí puedan ser analizados adecuadamente con este agregado.

En la etapa de *clean-up* de tipo dispersivo se pueden emplear diferentes sorbentes en función de las características de la matriz en estudio. Se emplea PSA (amina primaria/secundaria) para la eliminación de ácidos orgánicos y pigmentos polares y RP-C<sub>18</sub> para la eliminación de la mayor parte de los lípidos y esteroides presentes en las matrices con alto contenido graso.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos y materiales

Acetonitrilo (MeCN) y Acetato de etilo (AcOEt) calidad HPLC fueron comprados a Pharmco (Brookfield, CT, USA). Sulfato de magnesio anhidro (MgSO<sub>4</sub>), Acetato de sodio anhidro (NaAc), Amina primaria y secundaria (PSA) y RP-C<sub>18</sub> fueron obtenidos de Scharlab S.L (Barcelona, España).

Los estándares de pesticidas de alta pureza fueron obtenidos de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania) y guardados a -20 °C. Las soluciones madre individuales de cada pesticida (2000 mg L<sup>-1</sup>) fueron preparadas en AcOEt y guardadas en viales de vidrio color ámbar con tapa rosca y contratapa de teflón y en ausencia de luz a -20 °C. Los mix de soluciones stock utilizados para las calibraciones y las fortificaciones fueron preparados a partir de las soluciones stock individuales mediante diluciones adecuadas.

### Instrumentos

Los residuos de pesticidas se analizaron usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-QqQ-MS). El equipo empleado fue un GC 2010 Ultra acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo TQ8040 (Shimadzu). El volumen de inyección fue de 1 µL de cada muestra en modo splitless y se usó un autosampler AOC 20 i+s. Se empleó una columna capilar RXi-5MS Sil (5% difenil/95% dimetil polisiloxano, 30 m; 0,25 mm d.i; 0,25 µm film) de Restek (Bellefonte, PA, USA). La temperatura del inyector fue 280 °C, el gas portador empleado fue Helio de alta pureza a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. El programa de temperatura del horno se describe en la Tabla 1.

**TABLA 1.** Condiciones del programa de temperatura del horno del cromatógrafo de gases empleado en el estudio.

°C/min	Temperatura final (°C)	Tiempo de espera (°C)
-	80	2
20	180	0
5	300	3
Tiempo total de corrida: 34 minutos		

La temperatura de la interfase fue 300 °C y la temperatura de la fuente de ionización fue 230 °C. Se trabajó con un voltaje del detector de 1,25 kV y se empleó Argón (200 kPa) como gas de colisión. En todos los experimentos se operó en modo de Monitoreo de Reacciones Múltiples (MRM), ajustando las energías de colisión (EC) y empleando Smart Pesticide Database (SPDB) y MRM Optimization Tool (Restek, Bellefonte, PA, USA), como se describe en la Tabla 2.

**TABLA 2.** Optimización por GC-QqQ-MS de los 30 analitos evaluados en este estudio.  $t_R$ : tiempo de retención; EC: Energía de colisión expresada en V.

Analito	$t_R$ (min)	1° Transición		2° Transición	
		m/z	EC (V)	m/z	EC (V)
1 Etoprofos	9,385	200,00 > 158,00	6	200,00 > 114,00	14
2 Monocrotofos	9,815	127,10 > 109,00	12	127,10 > 95,00	16
3 Cadusafos	9,903	158,90 > 130,90	8	158,90 > 97,00	18
4 Diazinon	11,020	304,10 > 179,10	10	304,10 > 162,10	8
5 Teflutrina	11,322	177,00 > 127,10	16	177,00 > 137,10	16
6 Clorpirifos metil	12,284	285,90 > 93,00	22	285,90 > 270,90	14
7 Fenclorfos	12,737	284,90 > 269,90	16	284,90 > 93,00	24
8 Pirimifos metil	13,003	305,10 > 180,10	8	305,10 > 290,10	12
9 Fenitrotion	13,116	277,00 > 260,00	6	277,00 > 109,10	14
10 Malation	13,314	173,10 > 99,00	14	173,10 > 127,00	6
11 Fention	13,553	278,00 > 109,00	20	278,00 > 125,00	20
12 Clorpirifos etil	13,674	313,90 > 257,90	14	313,90 > 285,90	8
13 Clorfenvinfos	14,500 14,827	323,00 > 267,00	16	323,00 > 295,00	6
14 Fipronil	14,714	366,90 > 212,90	30	366,90 > 254,90	22
15 Aletrina	14,924 14,967	136,10 > 93,10	14	136,10 > 77,10	26
16 Etion	18,002	230,90 > 174,90	14	230,90 > 184,90	12
17 Piretrina	18,634	123,10 > 81,00	8	123,10 > 67,00	6
18 Butóxido de piperonilo	20,041	176,10 > 131,10	12	176,10 > 117,10	20
19 Tetrametrina	20,760 21,063	164,10 > 107,10	14	164,10 > 77,00	22

	Analito	t <sub>R</sub> (min)	1° Transición		2° Transición	
			m/z	EC (V)	m/z	EC (V)
20	Bifentrina	20,952	181,10 > 166,10	12	181,10 > 153,10	8
21	Clorantraniliprole	21,215	278,00 > 249,00	20	280,00 > 251,00	20
22	Cialotrina (lambda)	22,495 22,835	197,00 > 161,00	8	197,00 > 141,00	12
23	Permetrina	24,328 24,583	183,10 > 168,10	14	183,10 > 165,10	14
24	Cumafos	24,550	362,00 > 109,00	16	362,00 > 226,00	14
25	Ciflutrina	25,396 25,598 25,705 25,797	226,10 > 206,10	14	226,10 > 199,10	6
26	Cipermetrina	26,013 26,224 26,325 26,414	181,10 > 152,10	22	181,10 > 127,10	22
27	Fenvalerato	27,712	419,10 > 225,10	6	419,10 > 167,10	12
28	Esfenvalerate	28,120	419,10 > 225,10	6	419,10 > 167,10	12
29	Fluvalinato (tau)	27,982 28,123	250,10 > 200,10	16	250,10 > 55,00	18
30	Deltametrina	28,785 29,158	252,90 > 93,00	20	252,90 > 171,90	8

## Selección de los analitos de interés y validación de la metodología

La selección de los analitos del estudio se hizo en base a un análisis de mercado y a la lista de importación de fitosanitarios del MGAP 2012-2017 (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, s.d.) para uso en ganadería. Se seleccionaron un total de 30 activos entre piretroides (Py) y organofosforados (OP).

## Muestras

Las muestras de leche empleadas para el desarrollo y validación del método fueron obtenidas de un tambo del departamento de Artigas y guardadas en freezer a -18 °C hasta su estudio. El tiempo máximo de conservación de la muestra en freezer previo a su análisis fue de 45 días.

## Preparación de muestra

### Extracción

Para la extracción se siguió el esquema de QuEChERS AOAC 2007.01 (AOAC International, 2016) para matrices con alto contenido en grasa (Lehotay, et al., 2005).

Se homogeneizó la muestra a temperatura ambiente (25 °C) y en shaker mecánico durante 10 minutos, se pesaron (10,00 ± 0,05) g de leche cruda en un tubo

de polipropileno de 50 mL. Se agregaron 10 mL de MeCN (1% HAc) y se agitó manualmente durante 1 minuto.

Se agregaron 4 g de MgSO<sub>4</sub> y 1 g de NaAc y se agitó vigorosamente durante 1 minuto. Se centrifugó durante 5 minutos a 1400 RCF.

### Clean-up dispersivo (d-SPE)

Se tomó una alícuota de 4 mL del sobrenadante y se colocó en un tubo de polipropileno de 15 mL con 200 mg PSA, 200 mg RP-C<sub>18</sub> y 600 mg MgSO<sub>4</sub>.

Se llevaron los tubos a un vortex y se agitó durante 30 segundos a 1000 RCF. Posteriormente se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 1400 RCF. Se tomaron 2 mL del sobrenadante purificado, se colocaron en tubos de vidrio y se evaporó el solvente empleando corriente de N<sub>2</sub> en un Turbovap® con un baño de agua a 45 °C.

Se retomó el residuo en 1,00 mL de AcOEt calidad HPLC, se filtró el extracto empleando filtros de jeringa de PTFE de 0,45 µm y se transfirió a un vial color ámbar de autosampler para su inyección en GC-QqQ-MS.

### Validación de la metodología

Se validó la metodología de acuerdo con los lineamientos del documento SANTE/11831/2017 de la Unión Europea (European Commission. Directorate General for Health and Food Safety, 2017), en el cual se establece una serie de procedimientos analíticos y su validación para el análisis de residuos de pesticidas en alimentos y piensos. Se describen abajo las cifras de mérito evaluadas.

### Veracidad

Se evaluó la veracidad del método a través de los porcentajes de recuperación para cada analito a cinco concentraciones: 5; 10; 20; 50 y 100 µg kg<sup>-1</sup> (n=5 para todos los casos). Para realizar las recuperaciones se empleó una muestra blanco a temperatura ambiente y se adicionaron los volúmenes apropiados de las soluciones stock de los pesticidas seleccionados para lograr las concentraciones de trabajo. Las fortificaciones se agitaron empleando Vortex durante 1 minuto a 1000 RCF y se dejaron reposar durante 15 minutos antes de comenzar los análisis.

### Precisión

La precisión se evaluó a través del grado de dispersión de las recuperaciones a cada concentración de trabajo. Se evaluó a través de la repetitividad (dispersión de los resultados de un batch de trabajo en un período corto de tiempo) y de la precisión intermedia (dispersión de los resultados de un batch de trabajo realizado en diferentes días por tres diferentes analistas).

### Linealidad

La linealidad se evaluó en solvente y en matriz (*matrix matched calibration*). Se analizaron coeficientes de determinación (R<sup>2</sup>) y “back-calculated concentration” (BCC); además se realizó una inspección visual para cada caso.

## Efecto matriz

El efecto matriz se evalúa como la relación entre la sensibilidad analítica de la curva preparada en matriz en relación a la sensibilidad de la curva de calibración preparada en solvente.

Se calculó el efecto matriz expresado en forma porcentual empleando la Ecuación 1.

$$EM (\%) = \left[ \left( \frac{\text{pendiente } CCM}{\text{pendiente } CCS} \right) - 1 \right] \times 100 \quad [1]$$

*CCM*: curva de calibración en matriz; *CCS*: curva de calibración en solvente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Estudios preliminares

Al inicio de este trabajo se plantearon tres alternativas para la determinación de ectoparasiticidas lipofílicos en leche cruda. El contenido de grasa en la matriz de trabajo dificulta la extracción de compuestos con  $K_{ow}$  elevados, entre ellos los que pertenecen a las familias de los piretroides y los organofosforados.

Se planteó el esquema QuEChERS adaptado por Lehotay para matrices con elevado contenido en grasa (Lehotay, et al., 2005). Particularmente se realizó un desgrasado con hexano y luego un *freeze-out* de 12 horas. La propuesta del desgrasado con hexano se planteó como alternativa para poder remover el elevado contenido de grasa presente en la leche cruda, donde los ácidos grasos se particionan hacia la fracción hexánica permitiendo una mejor limpieza del extracto de MeCN. Se completó la reducción a un mínimo del contenido en lípidos en el extracto empleando la metodología denominada *freeze out*, que consiste en precipitar las grasas a bajas temperaturas. Se dejaron en este experimento los tubos en freezer a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas y se tomó de la fase orgánica para continuar con el esquema del *clean-up* dispersivo propuesto por Lehotay et al., 2005.

La comparación de las tres metodologías a través de la evaluación de los porcentajes de recuperación al nivel de  $100\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$  arrojó resultados favorables hacia la primera opción, por lo que se eligió el método QuEChERS para continuar con la validación de la metodología.

### Validación de la metodología

Se realizaron recuperaciones a cinco concentraciones diferentes, por quintuplicado ( $n=5$ ) para todos los casos. Los valores de recuperaciones y las desviaciones estándares relativas expresadas en forma porcentual se muestran en la Tabla 3.



**TABLA 3.** Porcentajes de recuperación (Rec) a las cinco concentraciones de trabajo y sus desviaciones estándares relativas (RSD) asociadas.

	Analito	5 µg kg <sup>-1</sup>		10 µg kg <sup>-1</sup>		20 µg kg <sup>-1</sup>		50 µg kg <sup>-1</sup>		100 µg kg <sup>-1</sup>	
		Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
1	Etoprofos	-	-	69	11	71	13	78	13	73	3
2	Monocrotofos	-	-	106	16	103	11	114	8	122	14
3	Cadusafos	-	-	75	9	70	11	74	7	73	6
4	Diazinon	-	-	73	8	75	9	72	5	79	4
5	Teflutrina	-	-	70	6	72	8	79	3	74	2
6	Clorpirifos metil	74	15	87	12	81	13	79	5	82	7
7	Fenclorfos	-	-	76	9	76	9	78	3	75	4
8	Pirimifos metil	70	11	79	7	90	7	74	2	79	3
9	Fenitrotrion	79	19	104	5	101	15	71	3	86	12
10	Malation	76	16	106	4	105	10	75	4	88	10
11	Fenthion	101	13	107	5	105	6	86	3	93	3
12	Clorpirifos etil	-	-	89	8	83	11	74	3	74	3
13	Clorfenvinfos	92	17	99	9	111	13	89	3	90	8
14	Pipronil	72	17	122	3	120	11	95	4	111	10
15	Aletrina	90	20	104	8	94	9	85	5	88	5
16	Etion	76	12	105	3	104	6	87	2	89	2
17	Piretrina	-	-	-	-	-	-	115	7	100	5
18	Butóxido de piperonilo	83	14	97	2	95	5	82	2	83	2
19	Tetrametrina	85	17	117	3	112	8	89	3	94	5
20	Bifentrina	-	-	75	2	75	6	78	2	80	4
21	Clorantraniliprole	-	-	113	11	105	11	99	3	89	6
22	Cialotrina (lambda)	71	15	107	13	107	16	112	5	113	8
23	Permetrina	76	14	81	4	81	6	72	2	79	4
24	Cumafos	91	20	119	4	108	8	83	2	84	7
25	Ciflutrina	82	20	120	9	105	9	78	6	94	8
26	Cipermetrina	74	16	113	6	110	12	85	5	90	8
27	Fenvalerato	-	-	107	7	110	14	116	7	85	10
28	Esfenvalerate	-	-	121	12	105	13	111	7	88	10
29	Fluvalinato (tau)	70	15	107	2	104	16	131	8	81	14
30	Deltametrina	72	15	115	1	106	15	117	6	96	11

Se pudo comprobar que el método es veraz a todos los niveles de trabajo ya que los porcentajes de recuperación de los compuestos evaluados se encontraban entre (70-120)%. En casos como el del Etoprofos a 10 µg kg<sup>-1</sup>, el porcentaje es inferior al rango de aceptación (69%) pero con una desviación estándar relativa pequeña, por lo que el compuesto podría ser incluido en el método de análisis de rutina.

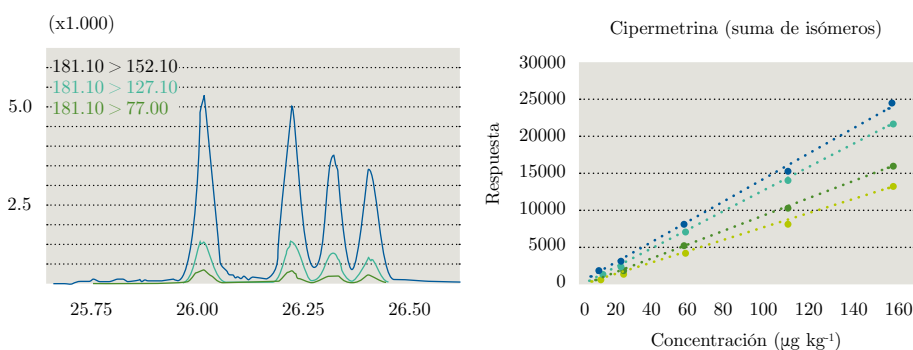
Al nivel más bajo, el 60% de los analitos se recupera con un porcentaje aceptable y cabe destacar que todos los analitos tienen al menos dos niveles de concentración en los que los criterios de veracidad y precisión se cumplen según los lineamientos de SANTE 2017 (European Commission. Directorate General for Health and Food Safety, 2017).

Respecto a la precisión, el grado de dispersión de las muestras expresado en la Tabla 3 como repetitividad fueron para todos los casos menores o iguales al 20%.

El ensayo de precisión intermedia se realizó con tres analistas evaluando todos los niveles de concentración trabajados. Los resultados obtenidos expresados como RSD (%) no superaron el 20%.

Para los estudios de linealidad se construyeron curvas de calibración con seis concentraciones en cada caso, tanto en solvente como en matriz.

Pese a que la guía SANTE (European Commission. Directorate General for Health and Food Safety, 2017) no exige inspección visual y evaluación de los coeficientes de determinación, se realizaron las curvas para cada analito de la respuesta analítica en función de la concentración (expresada en  $\mu\text{g}$  de pesticidas por kilogramo de leche). La Figura 1 muestra un gráfico de linealidad para Cipermetrina y su cromatograma.



**Figura 1.** A la izquierda, cromatograma de Cipermetrina. En el eje de las abscisas se grafica el tiempo (en minutos) y en el eje de las ordenadas, la respuesta analítica. A la derecha, curva de calibración en matriz (*matrix matched calibration*) para sus cuatro isómeros por separado. Para todos los isómeros se grafica concentración del pesticida en función de la respuesta analítica.

Para todos los casos se observa comportamiento lineal con  $R^2$  superiores a 0,99. Se realizaron los cálculos de “Back Calculated Concentration” (BCC) como se muestra en la Ecuación 2.

$$BBC (\%) = \frac{(C_{media} - C_{real})}{C_{real}} \times 100 \quad [2]$$

Para todos los casos, tanto en solvente como en matriz, los porcentajes de BCC fueron  $\pm 20\%$  cumpliendo con los requisitos establecidos por SANTE (European Commission. Directorate General for Health and Food Safety, 2017).

De esta manera, el rango lineal para todos los analitos fue de (2,5-150)  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Empleando la información obtenida del estudio de la linealidad (pendientes de las curvas de calibración), se utilizó la Ecuación 1 y se evaluó el efecto matriz en forma porcentual.

Todos los compuestos presentan un efecto de aumento de la señal en matriz con respecto a la calibración en solvente, excepto clorantraniliprole, que presenta supresión de señal.

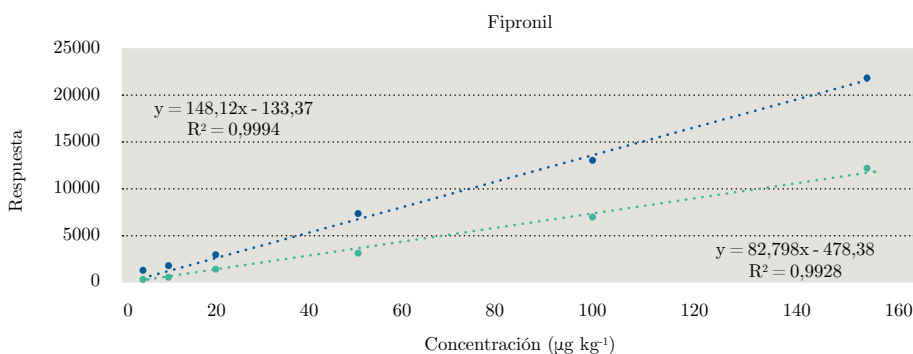
De los 30 compuestos evaluados, 21 presentan un efecto matriz bajo, es decir, el valor numérico obtenido de la Ecuación 1 (en módulo) se encuentra entre (0-20) %. Ocho compuestos presentan un efecto matriz moderado (20-50) % y solamente un compuesto presenta un efecto matriz elevado (>50 %). Esos resultados se pueden observar en la Tabla 4.

**TABLA 4.** Datos obtenidos para el estudio de linealidad y efecto matriz.  
Pend: pendiente de la curva de calibración; EM: Efecto matriz calculado empleando la Ecuación 1 y expresado en forma porcentual.

Compuesto	Solvente <i>pendiente</i>	Matriz <i>pendiente</i>	EM (%)	Clasificación	Interpretación
Etoprofos	620,8	644,8	4	Bajo	Aumento señal
Monocrotofos	221,1	233,8	6	Bajo	Aumento señal
Cadusafos	813,6	814,3	0	Bajo	Aumento señal
Diazinon	196,4	202,3	3	Bajo	Aumento señal
Teflutrina	3540,7	3581,6	1	Bajo	Aumento señal
Clorpirifós metil	181,7	187,6	3	Bajo	Aumento señal
Fenclorfos	417,3	424,3	2	Bajo	Aumento señal
Pirimifos metil	121,5	123,6	2	Bajo	Aumento señal
Fenitrotion	149,0	156,5	5	Bajo	Aumento señal
Malation	584,5	636,6	9	Bajo	Aumento señal
Clorpirifós etil	255,7	264,4	3	Bajo	Aumento señal
Fentión	348,0	463,7	33	Moderado	Aumento señal
Fipronil	82,8	148,1	79	Alto	Aumento señal
Aletrina I	111,4	116,3			Aumento señal
Aletrina II	99,3	102,6	4	Bajo	Aumento señal
Clorfenvinfos I	23,1	25,1			Aumento señal
Clorfenvinfos II	218,8	226,4	6	Bajo	Aumento señal
Etión	920,4	960,5	4	Bajo	Aumento señal
Piretrina I	90,7	110,2	22	Moderado	Aumento señal
Butóxido de piperonilo	1581,3	1668,4	6	Bajo	Aumento señal
Tetrametrina I	158,5	179,8			Aumento señal
Tetrametrina II	1242,4	1375,7	12	Bajo	Aumento señal
Bifentrina	8584,7	8884,1	4	Bajo	Aumento señal
Clorantraniliprole	205,6	188,5	-8	Bajo	Supresión señal
Cialotrina I	41,5	36,9			Aumento señal
Cialotrina II	499,6	590,8	18	Bajo	Aumento señal
Permetrina I	684,3	698,6			Aumento señal
Permetrina II	603,0	621,1	3	Bajo	Aumento señal
Cumafos	117,9	123,0	4	Bajo	Aumento señal

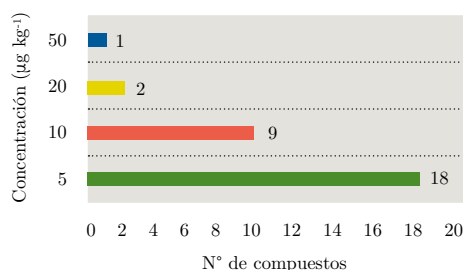
Compuesto	Solvente <i>pendiente</i>	Matriz <i>pendiente</i>	EM (%)	Clasificación	Interpretación
Ciflutrina I	27,8	32,9	23	Moderado	Aumento señal
Ciflutrina II	42,5	51,7			Aumento señal
Ciflutrina III	35,6	43,7			Aumento señal
Ciflutrina IV	74,4	95,5			Aumento señal
Cipermetrina I	136,2	163,8	24	Moderado	Aumento señal
Cipermetrina II	116,9	146,3			Aumento señal
Cipermetrina III	87,4	108,9			Aumento señal
Cipermetrina IV	69,9	88,6			Aumento señal
Fenvalerato	41,0	52,8	29	Moderado	Aumento señal
Esfenvalerato	22,4	29,0	30	Moderado	Aumento señal
Fluvalinato I	151,7	204,7	35	Moderado	Aumento señal
Fluvalinato II	145,7	197,1			Aumento señal
Deltametrina I	30,2	33,5	34	Moderado	Aumento señal
Deltametrina II	136,2	182,4			Aumento señal

Se puede observar en la Figura 2 la comparación de los gráficos de las curvas de calibración en solvente y matriz para Fipronil. Fipronil fue el único compuesto que presenta un EM positivo pronunciado (+79 %).



**Figura 2.** Comparación de las curvas de calibración realizadas para Fipronil. En verde, curva de calibración en solvente, y en azul, curva de calibración en matriz.

Respecto a los límites de cuantificación, se tomó como criterio establecerlo como el nivel más bajo de concentración al que se cumplen criterios de veracidad y precisión (recuperaciones entre 70-120 % con RSD's < 20%). Como se puede observar en la Figura 3, el límite para la mayoría de los compuestos es  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Solamente piretrina presenta un LOQ de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ .



**Figura 3.** Límites de cuantificación (LOQ) expresados en  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para los diferentes compuestos en estudio; 18 compuestos presentaron un LOQ de  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  (barra verde), nueve compuestos presentaron un LOQ de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  (barra naranja), dos compuestos un LOQ de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  y solamente un compuesto un LOQ a  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

## CONCLUSIONES

Se ajustó y validó una metodología multirresiduo para el análisis de ectoparasiticidas lipofílicos (piretroides y organofosforados) en leche cruda empleando un método sencillo, rápido y que demostró a través de los datos de la validación ser adecuado para su propósito.

La metodología validada es una herramienta útil para determinar curvas de decaimiento de los compuestos aplicados de manera de asegurar a la leche su calidad e inocuidad alimentaria.

Este método se emplea rutinariamente en el Laboratorio de Análisis de Residuos de Pesticidas (GACT) en Facultad de Química (UdelaR) para la determinación de ectoparasiticidas en leche vacuna.

## RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen a la Red Analítica de Laboratorios de América Latina y el Caribe (RALACA-IAEA) por proveer los estándares para el estudio, a Dexin (Grupo Químico SRL) y SHIMADZU Brasil (GC-Team: R. Kitamura y F. Róveri) por brindar el soporte de software e instrumental del equipo empleado.

## REFERENCIAS

- Anastassiades, M., Lehotay, S., Stajnbaher, D. y 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. En: *Journal of AOAC International*, 86(2), pp.412-431.
- AOAC International, 2016. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 20a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 2007.01, first action 2007-final action 2013.

- Codex Alimentarius, 2018. *Límites máximos de residuos (LMR) y recomendaciones sobre la gestión de riesgos (RGR) para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos* [En línea]. Roma: Codex Alimentarius. [Consulta: 03 de setiembre de 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/es/>
- European Commission. Directorate General for Health and Food Safety, 2017. *Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANTE/11813/2017*. [s.l.]: Unión Europea.
- González-Rodríguez, M.J., Arrebola-Liébanas, F.J., Garrido-Frenich, A., Martínez-Vidal, J.L. y Sánchez-López, F.J., 2005. Determination of pesticides and some metabolites in different kinds of milk by solid-phase microextraction and low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. En: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, pp.164-172.
- Lehotay, S., Mastovska, K. y Yun, S.J., 2005. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. En: *Journal of AOAC International*, 88(2), pp.630-638.
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, [s.d.]. *Datos estadísticos de importaciones de productos fitosanitarios* [En línea]. Montevideo: MGAP. [Consulta: 03 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/direccion-general-de-servicios-agricolas/tramites-y-servicios/servicios/datos>
- Souza, R., Cesio, M.V., Heinzen, H. y Pareja, Lucía, 2016. Desarrollo de una metodología para el análisis simultáneo de pesticidas y drogas veterinarias en leche. En: Universidad de la República. *4to Congreso Uruguayo de Química Analítica (CUQA)*. Montevideo, Uruguay, (25-28 de setiembre de 2016). Montevideo: Udelar.
- Trujillo-Parra, M.A., Peláez-Suárez, L., Londoño-Arango, J.E., Pérez-Almarino, N. y Rengifo-Benítez, G., 2003. *Los residuos de medicamentos en la leche. Problemática y estrategias para su control*. Bogotá: CORPOICA.