

VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN AGUA PARA CONSUMO HUMANO

Validation of methodology for pesticide residue analysis in drinking water

Adriana De Romedi¹
Mirtha M. Nassetta²
Roxana M. Córpora³

1 Diplomada en Auditoría
Bioquímica y Gestión de
Calidad.

Bioquímica
2 Dra en Química Orgánica
Lic. En Química Orgánica

3 Especialista en Higiene y
Seguridad en el Trabajo.
Ing. Química

Laboratorio de Pesticidas,
Ministerio de Ciencia y
Tecnología de la Provincia de
Córdoba. CEPROCOR

Resumen

Debido a que los plaguicidas ocupan un lugar importante dentro de las sustancias químicas a las que el hombre está expuesto, y frente a la necesidad de que los resultados obtenidos sean confiables, el objetivo de este trabajo consiste en la validación de la metodología analítica, basada en el método de Environmental Protection Agency (EPA) 505 revision 2.1 (1995): Analysis of organohalide Pesticide and commercial polychlorinated biphenyl (PCB) products in water by microextraction and gas chromatography, utilizando como valores de referencia los establecidos por el Código Alimentario Argentino, siguiendo los lineamientos de la norma de calidad ISO17025 :2005.

Para la extracción de los plaguicidas se utiliza la extracción líquido-líquido con hexano y posterior identificación y cuantificación por cromatografía de gases.

El método presenta muy buena sensibilidad con límites de detección de 0,003 a 0,3 µg/L y de cuantificación de 0,01 a 0,9 µg/L. En cuanto a la precisión del método medida como desviación estándar relativa es menor al 20% para todos los compuestos analizados. El método muestra una excelente linealidad en el rango de trabajo establecido, con coeficientes de determinación mayores a 0,995.

Palabras claves: Plaguicidas, validación, agua para consumo humano, salud pública.

Trabajo recibido:

12 mayo 2011

Aprobado:

1 de agosto 2011

Abstract:

Since pesticides are one of the main chemical substances human beings are exposed to and due to the need to obtain reliable results, the objective of this work is to validate the analytic methodology. It is based on the Environmental Protection Agency (EPA) 505 revision 2.1 (1995): Analysis of organohalide Pesticide and commercial polychlorinated biphenyl (PCB) products in water by microextraction and gas chromatography, using as reference the Maximum Residues Level (MRL) established by the Argentine Food Code, according to ISO17025: 1999.

For the extraction of pesticides, liquid-liquid extraction with hexane was used and later identification and classification was done by gas chromatography.

The method presents good sensitivity with detection limits ranging from 0.003 to 0.3 µg/L and quantification limits from 0.01 to 0.9 µg/L. As regards accuracy, relative standard deviation was below 20% for all the substances analyzed. The method shows excellent linearity in the work range established, with determination coefficients over 0.995.

Key words: Pesticides, validation, drinking water, public health

Introducción

La calidad del agua potable es un tema que preocupa en todos los países del mundo, desarrollados y no desarrollados, por su repercusión en la salud pública. Son factores de riesgo los agentes infecciosos, los productos químicos tóxicos y la contaminación radiológica¹.

El análisis de contaminantes químicos en el agua suele ser menos prioritario que los análisis microbiológicos, debido a que los efectos adversos de las sustancias químicas se producen a largo plazo.^{2,3} Los contaminantes químicos presentes en el agua pueden provenir de diversas fuentes: a partir de los suelos (cadmio, plomo, mercurio), por la polución proveniente de la actividad industrial del hombre (bifenilos policlorados, dioxinas) y a partir de las prácticas agrícolas (plaguicidas, drogas usadas en animales). Todos estos contaminantes pueden entrar en la cadena alimenticia y son un peligro potencial para la salud humana.

Dado el amplio uso de los plaguicidas, estos ocupan un lugar importante dentro de las sustancias químicas a las que el hombre está expuesto. Los principales usos de los plaguicidas son agrícolas, pecuarios, forestales, industriales, y en salud pública. También tienen uso doméstico, en parques y jardines, hoteles, hospitales, invernaderos, depósitos, medios de transporte, etc.

Plaguicida es toda sustancia o mezcla de sustancias destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o controlar cualquier tipo de plaga, incluidas las especies de plantas y animales indeseables durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos^{4,5}.

Esta definición nos muestra que al hablar de plaguicidas nos estamos refiriendo a un grupo de sustancias químicas muy heterogéneas, de diversa naturaleza, estructura y actividad biológica, lo que determina diferente toxicidad y hace muy difícil la clasificación de los riesgos para la salud humana.

Los efectos de los plaguicidas pueden ser agudos, es decir de rápida aparición y curso, generalmente en las primeras 24 horas, producidos por una sola dosis o por corta exposición; o crónicos, efectos que se observan a largo plazo y son el resultado de varias exposiciones, generalmente a cantidades pequeñas de la sustancia, repetidas por un tiempo prolongado, a menudo irreversibles.^{6,7,8}

Los COPs (compuestos organopersistentes) son sustancias químicas no biodegradables, se acumulan en los organismos vivos a través de la red alimentaria y suponen un riesgo al provocar daños en la salud humana y al medio ambiente. Los efectos humanos

incluyen, entre otros, cáncer, daños al sistema nervioso, interferencia con la capacidad reproductiva, disminución en el desarrollo intelectual de los niños y debilitamiento del sistema inmunológico.⁸

La contaminación del agua por plaguicidas se produce al ser arrastrados por el agua de los campos de cultivos hasta los ríos y mares donde se introducen en la cadena alimenticia. Los plaguicidas acumulados en el agua ponen en peligro la vida de vegetales y animales acuáticos. También se acumulan en los tejidos de algunos peces los que impacta en la salud de los grandes consumidores.^{9,10}

De la calidad del agua para consumo y la utilizada para cocción de alimentos que disponen las poblaciones, depende en gran medida la calidad de vida de las mismas, ya que el agua insalubre es uno de los diez factores de riesgo que producen mayor carga de morbilidad en el mundo, según estudios de la OMS.¹⁰

Debido a lo anterior existen reglamentaciones que establecen las concentraciones máximas permisibles de algunos plaguicidas en el agua lo que se conoce como Limite Máximo para Residuos de plaguicidas (LMR).

Limite máximo para residuos de plaguicidas (LMR) es la concentración máxima de residuo de un plaguicida, recomendada por el Codex Alimentarius, para que se permita legalmente su uso en la superficie o la parte interna de productos alimenticios para consumo humano y de piensos. Los LMR varían de un producto alimentario a otro, de un plaguicida a otro y de un país a otro.¹¹

Llamamos residuo de plaguicida a cualquier sustancia especificada presente en alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales como consecuencia del uso de un plaguicida, como productos de conversión, metabolitos y productos de reacción y las impurezas consideradas de importancia toxicológica. Incluye los residuos de procedencias desconocidas o inevitables (por ejemplo, ambientales) como los derivados de usos conocidos de la sustancia química en cuestión.¹¹

La Organización Mundial de la Salud (OMS) es un referente internacional para la formulación de normas que aseguren la inocuidad del agua potable y refleja también una importante preocupación por los contaminantes orgánicos. La OMS establece los límites de referencia teniendo en cuenta los efectos en la salud basados en la IDA (ingesta diaria admisible) recomendada por la JMPR (Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues) en 1970.^{11, 12, 13}

La EPA (Environmental Protection Agency) es uno de los principales organismos de referencia en material ambiental en el mundo.

Los LMR establecidos para agua de consumo humano en la provincia de Córdoba se basan en el Código Alimentario Argentino (CAA).

En la Tabla 1 se establece una comparación de las recomendaciones y limitaciones de la EPA¹⁴, la OMS^{2,13,15} y el CAA.¹⁶

Plaguicida	CAA (µg/L)	OMS (µg/L)	EPA (µg/L)
Aldrin + Dieldrin	0,03	0,03	*
Clordano	0,30	0,2	2
DDT (Total e isómeros)	1,00	1	*
Heptacloro+heptacloro epóxido	0,10	*	0,4-0,2
Metoxicloro	30,0	20	40
Lindano	3,0	2	0,2
Hexaclorobenceno	0,01	*	1
Metil paratión	7	*	*

Paratión	35	*	*
Malatión	35	*	*

Tabla 1: *La OMS y la EPA no fijan LMR para estos plaguicidas debido a que se han reportado valores en agua de consumo mucho menores que las que pueden producir efectos tóxicos.^{14, 15}

Para monitorear estos límites de residuos de plaguicidas se deben obtener muestras representativas y realizar el análisis en laboratorios especialmente dedicados a esta tarea, con analistas capacitados y utilizando metodologías desarrolladas y validadas bajo un sistema de gestión de calidad.

La calidad de los resultados obtenidos por el laboratorio depende de numerosos factores: humanos, instalaciones, equipos, métodos de ensayo, trazabilidad de las medidas, calibración y validación de métodos, muestreo, manipulación y gestión de muestra.

Para lograr el aseguramiento de la calidad de los resultados emitidos por el laboratorio, es necesario validar los métodos que se utilizan, de manera tal que los destinatarios se sientan satisfechos y confiados por los resultados proporcionados. La validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto¹⁷ y se logra a partir de la obtención de parámetros de trabajo, mediante experimentación y documentación de resultados, para finalmente detallar y/o corregir el procedimiento. La validación se realiza a través de ensayos de recuperación de muestras fortificadas a distintas concentraciones de acuerdo a los niveles de acción para cada analito establecido por la autoridad competente; lo cual permite determinar la eficiencia del método. A su vez intervienen por lo menos dos analistas para asegurar la reproducibilidad y repetibilidad de la metodología utilizada por el laboratorio.

Los parámetros que se analizan en la validación son: precisión, exactitud, linealidad, robustez, límite de detección y cuantificación.^{18,19,20}

Materiales y métodos

Diseño: Descriptivo de corte transversal realizado en el período 2008-2009.

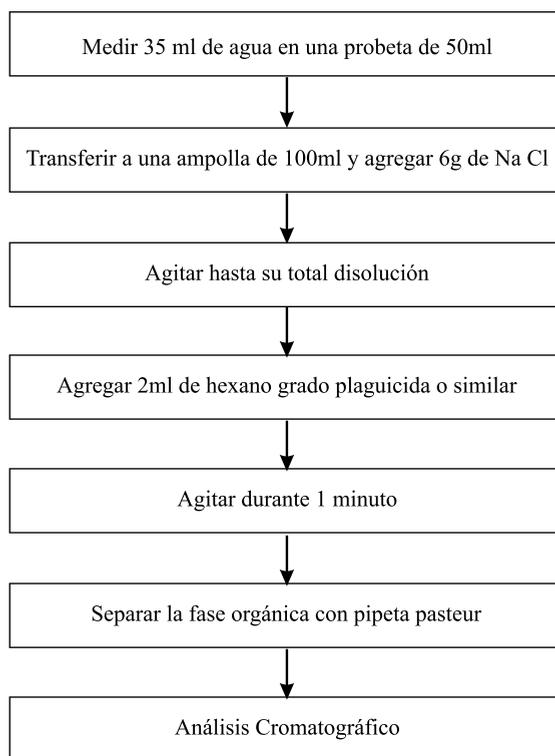
El proceso de validación de la metodología “Determinación de residuos de plaguicidas en muestras de Agua para consumo Humano” se realiza de la siguiente manera:

En primer lugar se definen los niveles a fortificar de acuerdo a los niveles de acción establecidos por el C.A.A. (Código Alimentario Argentino) para los siguientes analitos: Hexaclorobenceno, Heptacloro, Heptacloro epoxido, trans clordano, Dieldrin, pp'-DDE, pp'-DDT, pp'-DDD, op'-DDE, op'-DDT, Malatión, Paratión y Metil paratión. Se designan dos analistas calificados para realizar los ensayos de recuperación de estándares. Una vez definidos los analistas cada uno repite el ensayo que se describe más adelante sobre las muestras de agua fortificadas en los tres niveles de fortificación definidos para cada analito.

Las muestras se conservan a temperatura no mayor a 8° C y al resguardo de la luz.

A continuación se expone un esquema (Esquema I) de los pasos que componen el análisis de residuos de plaguicidas organoclorados y organofosforados en agua para consumo humano en nuestro laboratorio.

Esquema I. Metodología analítica para residuos de plaguicidas en agua para consumo humano ²¹



Las muestras son inyectadas en dos condiciones cromatográficas diferentes. La diferencia entre ambas condiciones debe radicar en la fase estacionaria de la columna cromatográfica utilizada en cada una de ellas. Los equipos utilizados son:

Para el análisis de plaguicidas organoclorados, se utiliza un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer modelo Autosystem XL, equipado con un detector de captura de electrones ECD⁶³, el cual presenta excelente sensibilidad para el análisis de átomos con capacidad para atraer electrones. Para resolver la mezcla de plaguicidas se utiliza una columna capilar RTX -5ms.

Para el análisis de plaguicidas organofosforados, se utiliza un cromatógrafo de gases marca Shimadzu modelo GC 14B, equipado con un detector fotométrico de llama con filtro para fósforo (FP) el cual presenta excelente sensibilidad durante los análisis de moléculas que posean átomos de fósforo. Para resolver la mezcla de plaguicidas se utiliza una columna capilar VF 17ms y SPB 50

Los parámetros metodológicos utilizados son el establecimiento de las ventanas de tiempos de retención de los analitos, el intervalo lineal de trabajo y los límites de detección y cuantificación de cada plaguicida.

La identificación de un analito en la muestra se realiza por comparación de su tiempo de retención con el tiempo de retención del estándar en dos condiciones cromatográficas que utilizan columnas capilares de polaridades diferentes.

Para la cuantificación se prepara una solución del estándar en una concentración tal que el área del mismo esté dentro del $\pm 25\%$ del área del analito identificado en la muestra y teniendo en cuenta que se encuentre dentro del ámbito lineal de trabajo establecido previamente.²²

Es importante destacar que se emplean estándares y reactivos de alta calidad siendo éstos últimos controlados por el laboratorio.

El criterio de aceptación de las recuperaciones en las muestras fortificadas en nuestro laboratorio es: 60-130%

Para el cálculo de la incertidumbre de medición se identifican todas las fuentes de incertidumbre y se confecciona un diagrama causa-efecto (Figura 1).²³

Diagrama Causa-Efecto

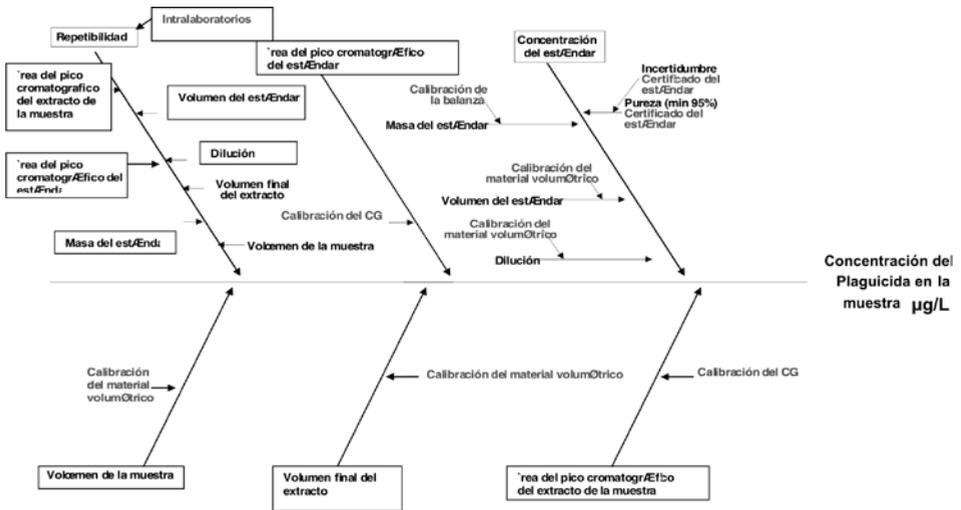


Figura 1: Fuentes de incertidumbre de la metodología en estudio

Resultados y discusión

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos por los dos analistas involucrados en el proceso de validación realizado en el período 2008-2009.

2008-2009					
Analito	Nivel de fortificación µg/L	Porcentaje de recuperación Analista 1	Porcentaje de recuperación Analista 2	Promedio de recuperaciones	SD *
Heptacloro	0,09	122	100	111	16
Heptacloro	1,76	60	63	62	2
Heptacloro exo	0,06	133	100	117	23
Heptacloro exo	1,24	115	105	110	7
pp'-DDE	0,009	100	89	95	8
pp'-DDD	0,022	60	109	85	35
op'-DDE	0,019	94	66	80	20
op'-DDT	0,024	99	64	82	25
pp'-DDT	0,038	85	50	68	25
pp'-DDT	1,78	100	113	107	9
metil paratión	3,98	140	170	155	21

metil paratión	5,57	119	128	123	17
metil paratión	8	125	125	125	0
malatión	27,28	102	125	114	16
malatión	36,37	129	122	126	5
malatión	45,46	99	93	96	4
paratión	16,9	129	153	141	17
paratión	23,8	111	116	113	14
paratión	34	112	115	114	2

Tabla 2: *Cuando la recuperación de los analitos no cumplen con el rango de trabajo establecido, se repiten las determinaciones hasta obtener el valor correcto.
*SD : Desviación estándar

La siguiente tabla Tabla 3 resume los valores numéricos de cada fuente de incertidumbre como así también la Incertidumbre relativa del nivel de plaguicida en la muestra.

Descripción	Valor de X	SD u (x)	RSD u (x)/x
Precisión	100	6,96	0,070
Sesgo	103	0,08	0,079
Temperatura	2	0,00	0,001
Pureza e estándares	99	0,29	0,003
Incertidumbre relativa del nivel de plaguicida en la muestra			0,105

Comparación de resultados con otra metodología

Se comparan los resultados obtenidos por la metodología, objeto de estudio del presente trabajo, con los obtenidos utilizando el método SPME (Micro extracción en fase sólida)

La microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica simple que aúna los pasos de extracción y concentración, no utiliza disolventes y permite la automatización en las etapas de preconcentración y análisis. La adsorción de los analitos se lleva a cabo por inserción de la fibra en la muestra y posterior desorción térmica para su análisis en el equipo de cromatografía de gases acoplado a un detector específico. En nuestro laboratorio se cuenta con un detector de espectrometría de masas. Se pueden utilizar volúmenes muy pequeños de muestra sin perder sensibilidad, pudiendo alcanzar la determinación de compuestos con los mismos límites de detección que los obtenidos por la microextracción líquido/líquido.

A continuación se muestran los resultados de algunos analitos, analizados por las dos metodologías. (Tabla 4)

Analito	Porcentaje de recuperación Método EPA 505	Porcentaje de recuperación SPME
HCB	70%	88%
Cis clordano	65%	115%

Conclusión

Los porcentajes de recuperación obtenidos para los analitos a validar, se encuentran dentro del rango de trabajo establecidos 60-130%.

El método muestra una excelente linealidad en el rango estudiado, con valores de coeficientes de correlación mayores a 0,995.

En cuanto a la precisión del método, medida como desviación estándar relativa, fue menor al 20%.

El método presenta una muy buena sensibilidad obteniendo límites de detección entre 3×10^{-3} a 1×10^{-2} µg/L para los plaguicidas organoclorados y 0,3 µg/L para los organofosforados. Los límites de detección obtenidos son comparables con la metodología validada por el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Almería –España.^{24, 25, 26}

El cálculo de incertidumbre de la metodología en estudio (RSD=0,105) es comparable con valores de bibliografía para el análisis de residuos de plaguicidas en pan²³ (RSD=0.34), y con la metodología validada por el laboratorio para la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos con contenido graso (RSD=0,073).

Los resultados obtenidos por la metodología en estudio son comparables dentro del rango establecido (60-130 %), con los obtenidos utilizando el método SPME (Microextracción en fase sólida) con cromatografía de gases acoplada a un detector de espectrometría de masas, que se utiliza en nuestro laboratorio.

Esta metodología fue utilizada para el monitoreo de aguas para consumo humano en el convenio con el ERSEP (Ente Regulador de Servicios Públicos de la Provincia) desde el año 2001 y actualmente sigue siendo aplicada en el laboratorio para realizar el monitoreo de las aguas de ríos y embalses de la provincia de Córdoba.

Bibliografía

1. OMS (Organización Mundial de la Salud) Guías de la OMS para calidad del agua potable. (Consulta, abril 2010). Disponible en : http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/guidelines/es/index.html
2. OMS (Organización Mundial de la Salud) Chemical safety of drinking water: Assessing priorities for risk management . (Consulta, abril 2010). Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/dwchem_safety/en/index.html
3. U.S. EPA (Environmental Protection Agency). Estándares del reglamento Nacional Primario de Agua Potable. (Consulta, abril 2010). Disponible en: <http://www.epa.gov/safewater/agua/estandares.html>
4. Sertox (Servicio de toxicología del sanatorio de niños) Efectos de los plaguicidas (Consulta, abril 2010). Disponible en: <http://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=278>
5. Alejandro Andrés Silvestre. Toxicología de los Alimentos. Capítulo IX, Edda Villaamil Lepori. Ed.1985
6. John Bernard Henry .Diagnostico y tratamiento clínicos en el Laboratorio. 9ª Edición-1993 -MASSON – SALVAT Medicina
7. Mohamad H. Badii, S. Varela - Insecticidas Organofosforados: Efectos sobre la Salud y el Ambiente. CUICT- Octubre 2008
8. Publicación Instituto Nacional de Ecología – El convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes y sus implicaciones para México. (consulta marzo 2010). Disponible en: http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/gacetitas/422/convenio.html?id_pub=422
9. Departamento de Sanidad. Gobierno Vasco. Vigilancia de la contaminación química de los alimentos en la Comunidad Autónoma del País Vasco 1990-1995. Ed. Dic. 1996
10. OMS (Organización Mundial de la Salud): Enfermedades relacionadas con el agua. (consulta, abril 2010). Disponible en : http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/es/

11. FAO (Food and Agriculture Organization of the united Nation) Limites máximos del Codex para residuos de pesticidas (consulta febrero 2010). Disponible en <http://www.fao.org/waicent/faostat/Pest-Residue/pest-s.htm>
12. FAO (Food and Agriculture Organization of the united Nation) Anexo 7: Presentación de la JECFA, la JMPR y la JEMRA y la evaluación de los riesgos de los alimentos genéticamente modificados. (consulta, abril 2010). Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/y8705s/y8705s0d.htm>
13. OMS (Organización Mundial de la Salud): Hojas de información sobre sustancias químicas. (consulta abril 2010). Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_12.pdf
14. U.S.EPA Environmental Protection Agency, Agua de grifo: Lo que usted debe saber. (consulta, abril de 2010). Disponible en: http://www.epa.gov/safewater/wot/pdfs/book_waterontap_enespanol_full.pdf
15. OMS (Organización Mundial de la Salud) Anexo 4: Chemical Summary tables. (consulta, abril 2010). Disponible en : http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/en/gdwq3_ann4tab.pdf
16. Código Alimentario Argentino, Capitulo XII, Pag 331
17. Norma Argentina IRAM 301* ISO/IEC 17025 Cuarta edición 2005-09-05: Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
18. Guía para validación de métodos de ensayo. Organismo Argentino de Acreditación. Fecha de entrada en vigencia :11 de junio de 2008
19. Quality control Procedures for Pesticide Residues Analysis. Document N° SANCO/10476/2003/f/February/2004.
20. Expresión de la incertidumbre de la medida en las calibraciones/ensayos. Organismo Argentino de Acreditación. Fecha de entrada en vigencia: 24 de octubre de 2007
21. U.S EPA (Environmental Protection Agency) 505 revision 2.1 (1995): Analysis of organohalide Pesticide and commercial polychlorinated biphenyl (PCB) products in water by microextraction and gas chromatography
22. Official Methods of Analysis of AOAC International – 17th Edition – Rev.2, 2003. Volume I Chapter 10: Pesticide and Industrial Chemical Residues
23. Eurachem/Citac Guide, “Quantifying uncertainty in analytical measurement” Ed.2000. CDS Tomlin.The Pesticide Manual .Eleventh Edition.1997
24. Determination of organochlorine pesticides in water samples by dispersive liquid - liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* *Analytica Chimica Acta* 649 (2009) 218–221. Journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/aca>
25. Solvent-based de-emulsification dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography - mass spectrometry for determination of trace organochlorine pesticides in environmental water samples. *Journal of chromatography A. Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 5896–5900. journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/chroma>
26. Asociación Española de Ecología Terrestre - Estudio de la contaminación por pesticidas en aguas ambientales de la provincia de Almería. Dpto. Química Analítica, Universidad de Almería. *Revista Ecosistemas* 13(3): 30-38. Septiembre 2004 (Consulta: Abril 2010). Disponible en: <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?ld=37>