

Residuos tóxicos en aceite de oliva, determinación de plaguicidas

EVARISTO BALLESTEROS TRIBALDO¹

NATIVIDAD RAMOS MARTOS²

ANDRÉS GARCÍA SÁNCHEZ¹

¹ Departamento de Química Física y Analítica. Escuela Politécnica Superior de Linares. Universidad de Jaén

² Departamento de Química Física y Analítica. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén

RESUMEN

El control de residuos tóxicos (orgánicos e inorgánicos) es uno de los principales puntos clave con vistas a la puesta en el mercado de un aceite de oliva de calidad. Para ello se están desarrollando diferentes metodologías basadas en técnicas cromatográficas (residuos orgánicos) o técnicas de espectroscopía atómica (residuos metálicos). En este trabajo se propone un método para la determinación de residuos de plaguicidas en aceite de oliva. El procedimiento está dividido en tres etapas: extracción líquido-líquido, eliminación de interferencias de la matriz mediante cromatografía de geles y determinación mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas. Del estudio de viabilidad del método en términos de exactitud y precisión se puede concluir que éste puede ser utilizado para el análisis rutinario de plaguicidas en los laboratorios de control de calidad del aceite de oliva. La metodología propuesta presenta notables ventajas con respecto a otros métodos propuestos en la bibliografía tales como simplicidad, reducción de consumo de reactivos y disolventes, y disminución de riesgos para el personal y el medio ambiente.

ABSTRACT

Controlling toxic residues of both organic and inorganic nature is one of the keys to market-ing quality olive oil. This challenge is being met by developing effective methodologies based on chromatographic and atomic spectroscopic techniques for organic and metallic residues, respectively. In this work, we developed a new method for the determination of pesticide residues in olive oil. The operating procedure involves liquid-liquid extraction, removal of matrix interferences by gel chromatography and determination of the analytes by gas chromatography-mass spectrometry. Based on its accuracy and precision, the proposed method can be used for the routine analysis of pesticides in olive oil quality control laboratories. The method has some advantages over existing alternatives that include greater simplicity, reduced consumption of reagents and solvents, and lower personal and environmental risks.

1. INTRODUCCIÓN

El olivo de la variedad *Olea europea*, protagonista indiscutible en la agricultura de todos los países de la cuenca Mediterránea y su aceite obtenido a partir de la aceituna (oliva virgen), tiene una composición rica en ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico) y un alto contenido en componentes con naturaleza antioxidante, tales como los tocoferoles, (vitamina E), presentando unas propiedades medicinales, nutritivas. Todas estas bondades han sido demostradas científicamente, lo convierten en un producto natural único y en un componente habitual e imprescindible en la dieta Mediterránea (Aparicio y Harwood, 2003).

Como todo cultivo, el olivo está expuesto a una serie de plagas que afecta a la calidad de la aceituna y a su vez a la del aceite. En la Tabla 1 se muestra la tolerancia de las distintas variedades de aceituna a las plagas más frecuentes. Para combatir la variedad de enfermedades que puede sufrir y así, asegurar la salud de la aceituna para garantizar la calidad que como producto natural posee el aceite, el olivo se trata con compuestos fitosanitarios entre ellos los plaguicidas. Es por ello, el interés de todos los países productores en tomar las medidas oportunas en cuanto a la periodicidad, cantidad, tiempo de espera y en definitiva al control del empleo de plaguicidas en los tratamientos agrícolas, para conseguir una aceite exento de residuos que no superen los límites establecidos por las distintas Instituciones, y sea inocuo para la salud (Barranco *et al.*, 1999).

La naturaleza de los plaguicidas empleados con el tiempo para el tratamiento del olivar ha tenido que ser diferente a medida que científicamente se demostraban los efectos nocivos que ejercían sobre los seres vivos. De esta manera, la composición de los plaguicidas empleados a partir de 1892 corresponden a compuestos orgánicos sintéticos, sin resultados favorables, por ello, fueron sustituidos en 1939 por el DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), cuyo éxito estimuló el desarrollo de otros componentes organoclorados; éstos han sido utilizados sin control, hasta que se ha demostrado, su persistencia en el medio ambiente (años), su solubilidad en los tejidos grasos y su falta de degradación biológica, suponiendo una bioacumulación en el hombre (Ashrat-Khorassani, 1996). Esto ha llevado al desarrollo de plaguicidas organofosforados, compuestos inhibidores irreversibles de la enzima acetilcolinesterasa, (encargada de las transmisiones neurológicas) en insectos garrapatas y mamíferos. Son altamente tóxicos, pero presentan una vida media corta (días); además en los mamíferos son metabolizados para producir en uno o dos días productos inocuos, no provocando una bioacumulación en los tejidos animales. Pero la progre-

siva resistencia generada por los insectos a estos compuestos, hace que se tengan que aumentar las dosis usadas para eliminarlos y por tanto, que el hombre se vea expuesto a intoxicaciones agudas. La introducción de otro tipo de insecticidas, carbamatos, y piretroideos sintéticos (piretrinas), disminuye el uso de los anteriores y dejan a unos productos que son rápidamente biodegradables y no acumulables. Presentando la ventaja estos últimos, de ser extraordinariamente efectivos contra las plagas requiriendo menos dosis (Hajslová, 1999).

En los últimos años, los niveles de plaguicidas detectados en distintos alimentos vegetales, pescados, carnes, frutas han preocupado a la comunidad científica y a los Organismos responsables sobre Seguridad Alimentaria, tanto a nivel Internacional como Europeo, y a países afectados directamente por la presencia de estos componentes tóxicos de alto riesgo en la alimentación humana.

La Organización Mundial de la Salud (WHO) y la Organización de Agricultura y Alimentos (FAO) han estudiado la toxicidad de los plaguicidas en alimentos y han establecido los límites máximos de residuos (LMRs) de plaguicidas en alimentos (WHO, 1990a,b). La Comisión del Código Alimentario de la FAO-WHO estableció los LMRs para residuos de plaguicidas en aceitunas (FAO-WHO, 1996). Así mismo la Unión Europea ha fijado los niveles máximos de plaguicidas en alimentos, incluyendo aceitunas (UE, 2001). También en España se ha establecido el límite máximo de residuos de plaguicidas en alimentos, incluidas aceitunas (BOE, 1994) y se recomienda como límite máximo en aceite de oliva, cuatro veces el límite máximo de residuos en aceitunas.

No obstante, la comunidad científica continúa desarrollando trabajos de investigación para establecer métodos de análisis cada vez más sensibles, selectivos y rápidos que puedan ser empleados en el análisis de rutina de los laboratorios de control y calidad de los aceites, para asegurar el cumplimiento de las normas vigentes.

2. MÉTODOS EXISTENTES EN LA BIBLIOGRAFÍA SOBRE EL ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS EN ACEITE DE OLIVA

2.1. Métodos de pretratamiento de muestra

Como se verá en el apartado siguiente, los plaguicidas son preferentemente determinados por cromatografía de gases o cromatografía líquida en columna. Sin embargo, para poder realizar estas determinaciones

en alimentos es necesario etapas previas de tratamiento de muestra con vistas a diferentes objetivos: a) modificar la matriz de la muestra; b) extraer los analitos de interés de la muestra; c) eliminar componentes co-extraídos de la matriz para evitar su interferencias del análisis; y d) derivatizar los pesticidas para facilitar la separación/detección (Ballesteros Tribaldo, 2004).

La mayoría de la metodología usada para la determinación de multiresiduos en aceite de oliva se basan en la extracción con n-hexano o éter de petróleo, seguida de una etapa de limpieza de los extractos («clean-up») y de la determinación cromatográfica (Lentza-Rizos y Avramides, 1995). Muchos de los procedimientos de «clean-up» se basan en el fraccionamiento del extracto mediante extracción líquido-líquido (Hiskia *et al.*, 1998) o en la adsorción sobre un sólido tal como Florisil, alúmina o gel de sílice (Ballesteros y Parrado, 2004; Tekel y Hatrík, 1996). En los últimos años se ha desarrollado un nuevo procedimiento de cromatografía de geles (GPC) para eliminación de interferencias (Jongenotter *et al.*, 1999). Las columnas de GPC rellenas de un polímero poroso retienen las moléculas más pequeñas que sus poros. Por ello las moléculas lipídicas, demasiado grandes para penetrar a través del material poroso, no son retenidas, y son eluidas en primer lugar de la columna (Rossi *et al.*, 2001).

Tabla 1. Tolerancia¹ de los cultivos de olivo a las principales plagas

	Dacus Oleae	Liothrips oleae	Margaronia Unionalis	Prays Oleae	Saissetia Oleae
Arbequina		0			0
Blanqueta		0			
Cañivano blanco				1	
Cañivano negro		0			
Carrasqueño		0			
Carrasqueño de Alcaudete					
Carrasqueño de la Sierra		1			
Cornezuelo		1			
Cornicabra		0			
Empeltre		0			0
Farga		0			
Frantoio		0		1	1
Gordal sevillana		1			0
Hojiblanca		0			0
Lechín de Granada		0			0
Lechin de Sevilla		2			0
Manzanilla de Jaén		1			
Manzanilla de Sevilla		0		0	0

Morrut	2			
Negral	1			
Nevadillo negro		2	2	
Nevadillo blanco	0			0
Nevado azul	1			1
Oblonga				
Pico limón	0		0	
Picual	0		0	0
Picudo	0			
Rapasayo				0
Verdial de Alcaudete				0
Verdial de Badajoz	1		0	
Verdial de Huevar	1			0
Verdial de Velez-Málaga	2			0
Villalonga				

0=Tolerancia baja, 1=Tolerancia media, 2=Tolerancia alta

2.2. Métodos de determinación

La cromatografía de gases (CG) o la cromatografía líquida en columna (CLC) son las dos técnicas que normalmente se utilizan para la determinación de multirresiduos de plaguicidas. Los detectores de CG usados para este propósito son ionización de llama, nitrógeno fósforo (Ballesteros *et al.*, 1996), captura de electrones (Ballesteros *et al.*, 1993) y de fotometría de llama. En los últimos años, el acoplamiento de la CG a un espectrómetro de masas (EM) resuelve los problemas de identificación que tenían los otros detectores (Barrek *et al.*, 2003). La sensibilidad y selectividad en la determinación de plaguicidas se puede mejorar mediante el uso del tandem EM-EM que proporcionan los sistemas de trampas de iones (Sheridan y Meola, 1999).

Por otro lado, los detectores de absorción en el UV son los más utilizados en CLC para la determinación de plaguicidas (Farran *et al.*, 1990). También se están utilizando otros detectores tales como diodos en fila UV (Tauler *et al.*, 1996) y espectrometría de masas (Barrek *et al.*, 2003).

Otras técnicas no cromatográficas se han aplicado a la determinación de plaguicidas. Entre ellas cabe destacar la electroforesis capilar, así Tegeler y El Rassi (2001) han desarrollado un método para la determinación de carbamatos con límites de detección de $2 \cdot 10^{-5}$ M. En la última década también se están utilizando técnicas de inmunoensayo (Nunes *et al.*, 1998) y biosensores (Xavier *et al.*, 2000) para la cuantificación de plaguicidas.

3. MÉTODO PROPUESTO PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS

Para la determinación de plaguicidas se ha utilizado un cromatógrafo de gases con detección de espectrometría de masas (CG/EM) con una columna capilar de 30 m. La separación de fases de las muestras de aceite se lleva a cabo mediante cromatografía de geles con una columna rellena de polímero (Bio Beads SX 3).

El procedimiento de eliminación de interferencias de la muestra y determinación se resume en la Figura 1. Este se divide en varias etapas: 1) pesada de varios gramos de muestra de aceite y filtrado; 2) adición de una mezcla de n-hexano y acetonitrilo para llevar a cabo la extracción líquido-líquido; 3) secado del extracto y re-extracción mediante un rotavapor; 4) separación de fases mediante cromatografía de geles; 5) preconcentración de la fase de plaguicidas; y 6) determinación por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas.

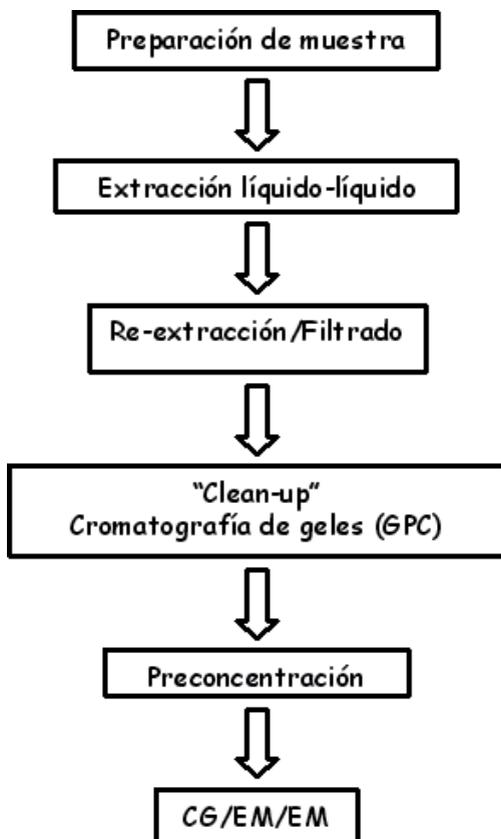


Figura 1: Procedimiento seguido para la determinación de plaguicidas en aceite de oliva

Las fórmulas químicas de los plaguicidas determinados mediante el método desarrollado se representan en la Figura 2. También se incluyen el tipo de plaguicida así como el LD₅₀ (dosis mortal en mg/kg para el 50 % de los individuos tratados con esta sustancia, ratas)

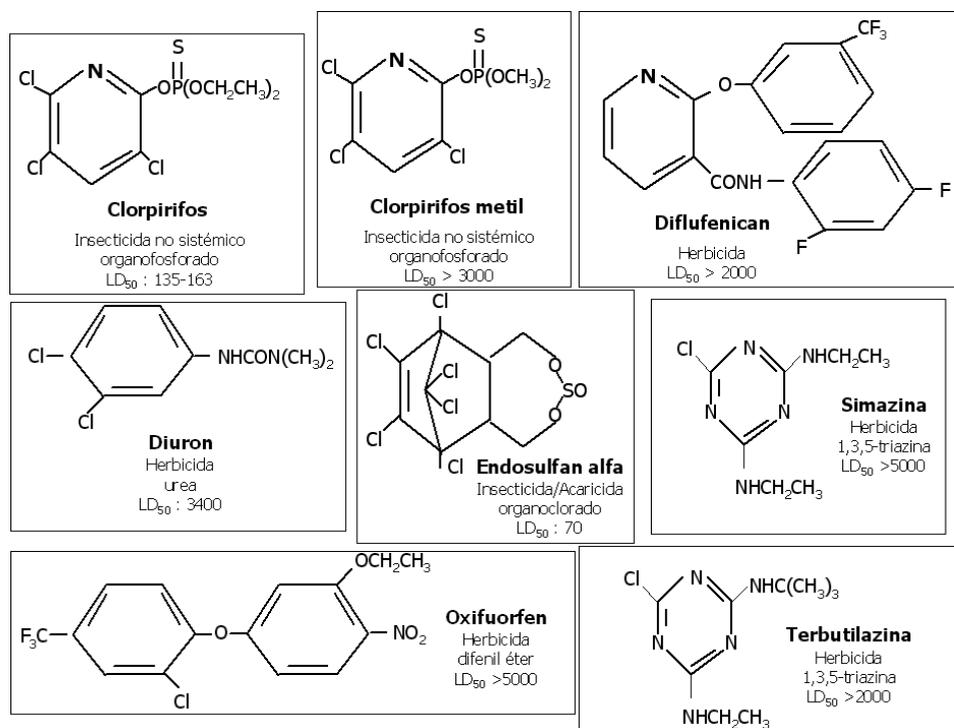


Figura 2: Plaguicidas determinados en el método propuesto

3.1. Resultados

Se realizó un estudio de precisión del método propuesto, para ello se analizaron 11 muestras de aceite de oliva a las que se le habían añadido 0.1 mg/kg de plaguicidas. Los valores de la desviación estándar estaban comprendidos entre 3.8 y 7.5 %. Los límites de detección en todos los casos fueron inferiores a 0.001 mg/kg.

Para realizar el estudio de la exactitud se añadió concentraciones de 0.01, 0.050 y 0.100 mg/kg de los plaguicidas a muestras de aceite de oliva y se analizaron. Los valores de recuperación eran en todos los casos próximos al 100 %.

Finalmente el método que se ha propuesto se ha aplicado al análisis de 30 muestras de aceite de oliva virgen encontrándose algunos resi-

duos de plaguicidas (simazina, clorpirifos, difluncan, terbutilazina, diurón y endosulfan sulfato) en la mayoría de las muestras estudiadas como se puede observar en la Tabla 2. No obstante los valores encontrados están por debajo de los límites máximos de residuos propuestos en la legislación para aceituna o para aceite (4.5 veces superior).

Tabla 2. Resultados obtenidos en el análisis de 30 muestras de aceite de oliva

Plaguicida	% Muestras con residuos	Intervalo de concentración residuos (mg/kg)	LMR Aceituna (mg/kg)	LMR x 4.5 Aceite (mg/kg)
Clorpirifos metil	-	-	0.05	0.225
Endosulfan alfa y beta	-	-	0.05	0.225
Oxifluorfen	-	-	0.05	0.225
Simazina	7	0.01 – 0.03	0.10	0.450
Clorpirifos	13	0.01 – 0.04	0.05	0.225
Diflufenican	20	0.01 – 0.04	0.02	0.090
Terbutilazina	40	0.01 – 0.10	0.05	0.225
Diuron	93	0.02 – 0.15	0.20	0.900
Endosulfan sulfato	100	0.04 – 0.07	0.20	0.900

4. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha propuesto un método para la determinación de residuos de plaguicidas en aceite de oliva basado en dos técnicas de separación: a) cromatografía de geles para la eliminación de interferencias producidas por la matriz de la muestra, y b) cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas para la separación, identificación y cuantificación de los contaminantes. De los resultados obtenidos se puede concluir que la metodología propuesta simplifica notablemente a la existente en la bibliografía. Por otro lado se han conseguido una sensibilidad y selectividad que hace viable el uso del procedimiento propuesto para la determinación de plaguicidas a niveles por debajo de los LMRs establecidos por los Organismos Oficiales (FAO-WHO, 1996; UE, 2001; BOE, 1994).

5. BIBLIOGRAFÍA

- APARICIO, R. y HARWOOD, J. (2003). *Manual del Aceite de Oliva*. AMV Ediciones/ Mundi-Prensa.
- ASHRAF-KHORASSANI, M. y TAYLOR, L. T. (1996). *J. Agric. Food Chem.* 44: 3540.
- BALLESTEROS, E., GALLEGRO, M. y VALCÁRCEL, M. (1993). *Anal. Chem.* 65: 1773.
- BALLESTEROS, E., GALLEGRO, M. y VALCÁRCEL, M. (1996). *Environ. Sci. Technol.* 30: 2071.
- BALLESTEROS, E. y PARRADO, M. J. (2004). *J. CHROMATOGR. A*, 1029: 267.
- BALLESTEROS TRIBALDO, E. (2004) Carbamate Pesticides Residues in Food. In *Handbook of Food Analysis* (L. M. L. Nollet). Marcel Dekker, Capítulo 30.
- BARRANCO, D., FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R. y RALLO, L. (1999). *El Cultivo del Olivo*. Junta de Andalucía y Ediciones Mundi Prensa.
- BARREK, S., PAISSE, O. y GRENIER-LOUSTALOT, M. F. (2003). *Anal. Bional. Chem.* 376: 355.
- BOE (1994). Real Decreto 280/1994 de 18 Febrero (BOE 9/3/94) y sucesivas modificaciones: «Establece los límites máximos de residuos (LMR) de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal».
- FAO-WHO (1996). Codex Alimentarius Commision. Codex Alimentarius Pesticide Residues in Food-Maximum Residues Limits, 2nd Edn., Rome, Vol. 2B.
- FARRAN, A., Cortina J. L., DE PABLO, J. y BARCELÓ, D. (1990). *Anal. Chim. Acta* 234: 119.
- Hajslová, J. (1999). Pesticides. In *Environmental Contaminants in Food* (Moffat C. F. y Whittle K. J.). CRC Press. Capítulo 7.
- HISKIA, A. E., ATMAJIDOU, M. E. y TSIPi, D. F. (1998). *J. Agric. Food Chem.* 46: 570.
- JONGENOTTER, G. A., KERKHOFF, M. A.T., VAN DER KNAAP, C. M. y VANDEGINSTE, B. G. M. (1999). *J. High Resol Chromatogr.* 22:17.
- LENTZA-RIZOS, C. y AVRAMIDES, E. (1995) *Rev. Envir. Contam. Toxicol.* 141: 111.
- NUNES, G. S., MARCO, M. P., RIBEIRO, M. L. y BARCELÓ, D. (1998). *J. Chromatogr. A*, 823:109.
- ROSSI, S., DALPERO, A. P., GHINI, S., COLOMBO, R., SABATINI, A. G. y GIROTTI, S. (2001). *J. Chromatogr., A*, 905: 223.
- SHERIDAN, R. S. y MEOLA, J. R. (1999). *J. AOAC* 82: 982.
- TAULER, R., LACORTE, S. y BARCELÓ, D. (1996). *J. Chromatogr. A*, 730: 177.

- TEGELER, T. y EL RASSI, Z. (2001). *Anal. Chem.* 73:3365.
- TEKEL J. y HATRÍK S. (1996). *J. Chromatogr. A*, 754 : 397.
- UE (2001). Pesticide Residues European Commission, Brusells. http://europa.eu.int/comm/food/fs/ph_ps/pest/index_en.htm.
- WHO (1990a) Public Health Impact of Pesticides Used in Agricultura, World Health Organization, Geneva.
- WHO (1990b) Principles for Toxicological Assessment of Pesticide Residues in Food. Environmental Health Criteria, No. 104. World Health Organization, Geneva.
- XAVIER, M. P., VALLEJO, B., MARAZUELA, M. D., MORENO-BONDI, M. C., BALDINI, F. y FALAI, A. (2000). *Biosen. Bioelectron.* 14:895.