

Informe final publicable de proyecto

Evaluación experimental del riesgo de exposición a pesticidas de la población uruguaya basada en la dieta nacional

Código de proyecto ANII: FCE_1_2019_1_156599

Fecha de cierre de proyecto: 01/11/2022

HEINZEN GONZALEZ, Horacio (Responsable Técnico - Científico)

BESIL ARISMENDI, María Natalia (Investigador)

CESIO CESCOINI, María Verónica (Investigador)

NIELL MENEGAZZI, María Silvina (Investigador)

PAREJA PEREIRA, María Lucía (Investigador)

PÉREZ PARADA, Andrés (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO REGIONAL ESTE \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO REGIÓN LITORAL NORTE \\
FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA

Resumen del proyecto

Con el objetivo de conocer la exposición de la población a residuos de pesticidas, se monitoreo estacionalmente durante dos años la presencia de residuos de 95 pesticidas, en frutas, hortalizas, legumbres, arroz y leche expendidos en Montevideo. Se estudiaron además, residuos de 30 pesticidas en frutillas del país. Se validaron métodos analíticos para cada matriz siguiendo la clasificación del CODEX, realizando variaciones del método AOAC 2007.01. Se analizaron 320 muestras de 8 frutas y hortalizas, además 36 de frutillas, lentejas, garbanzos, arroz y leche. Se realizaron 28760 análisis individuales de residuos de pesticidas. Se detectaron residuos correspondientes a 27 pesticidas registrados en Uruguay en las muestras analizadas. No se detectaron residuos en las muestras de garbanzos, lentejas ni en leche pasteurizada. La mayoría de las muestras positivas tuvieron niveles de pesticidas por debajo del Límite Máximo de Residuos: LMR, pero se constataron desvíos de uso y excedencias. El caso más notorio fue procimidona, un fungicida detectado en citrus, zapallitos, manzanas cebollas y uvas para las que no tiene LMR definido en el CODEX, excediendo si el LMR que sí está estipulado en la Unión Europea. Con estos datos se planteó la realización de una evaluación de riesgo en base a la exposición detectada, que debido a la pandemia no pudo ser completada, realizándose un estudio determinístico de la presencia de fungicidas de la familia de ditiocarbamatos y los insecticidas diazinón y clorpirifos de acuerdo a la normativa aprobada en el país, demostrándose que la suma del total de LMRs autorizados para los ditiocarbamatos supera la ingesta diaria admisible para estos compuestos. Se obtuvo una primera visión sobre la presencia de residuos de pesticidas en Uruguay y sentó las bases para comenzar estudios de evaluación de riesgo para ajustar adecuadamente los LMRs autorizados en el país.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Químicas / Química Analítica / Determinación de residuos de pesticidas en al

Palabras clave: Residuos de pesticidas en alimentos / Análisis de trazas / Evaluación de riesgos /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

La producción de alimentos se basa en el uso de pesticidas o drogas veterinarias para mejorar su productividad y protegerla de plagas y pestes. A pesar de ser aplicados según las Buenas Prácticas Agrícolas, éstos pueden dejar residuos en los alimentos. La presencia y concentración de estos residuos se regula para asegurar la inocuidad del consumo de alimentos a través de Límites Máximos de Residuos (LMR) individuales para cada par pesticida/alimento. El LMR es un número determinado por la combinación del riesgo debido a la exposición y los residuos remanentes cuando los plaguicidas se aplican correctamente conforme a las Buenas Prácticas Agrícolas]. Estos se fijan combinando datos toxicológicos y la práctica agrícola/pecuario considerados en función de la participación estimada de ese alimento en la dieta para no superar la ingesta diaria admisible (IDA) de cada tóxico. El LMR es el nivel máximo de residuos de un plaguicida que se permite legalmente en los alimentos o piensos para cada combinación matriz-principio activo. La limitación de este proceso es que las dietas particulares de algunos países, como el nuestro, no son consideradas, por lo que es muy probable que ocurran desajustes exponiendo a la población a riesgos sanitarios desconocidos

Para garantizar alimentos cuyo consumo sea seguro, su inocuidad se construye en cada etapa de la cadena alimentaria, desde la producción hasta la cosecha, el procesamiento, el almacenamiento, la distribución y hasta la preparación. La inocuidad del alimento a consumir se asegura a través de la determinación exacta e inequívoca de los residuos de los compuestos tóxicos utilizados en los distintos paquetes tecnológicos empleados en la producción, dependiendo del cultivo, así como en la poscosecha y durante el almacenamiento. Se emplean también factores de seguridad para proteger distintos grupos etarios (lactantes, embarazadas, ancianos) y, con estos datos es posible fijar entonces un LMR, el cual es revisado constantemente por Comisiones Específicas en base a nuevos datos generados. A modo de ejemplo, es necesario consumir seis toneladas de tomates a lo largo de la vida de una persona para alcanzar el LOAEL de la cipermetrina, si todos los tomates contuvieran cipermetrina al nivel del LMR. En particular, Uruguay, para el control de los residuos en alimentos, se rige por el Codex Alimentarius (CA), organización supranacional que fija dichos LMRs para los diversos alimentos. Sin embargo, los LMRs del CA surgen de amplios consensos internacionales para ser aceptados por todos los países miembros. La limitación de este proceso es que las dietas particulares de cada país no son consideradas, por lo que es muy probable que ocurran desajustes exponiendo a la población a riesgos sanitarios desconocidos. Es por esa razón que diversas regiones y países del mundo adoptan sus propias LMRs en base a los consumos de la población. La dieta de los uruguayos es particular. La OMS la clasificó como la dieta McDonald's: Amplio consumo de carnes rojas, papas, escasa variedad de frutas y hortalizas. Por lo tanto, no se conoce el ajuste de esta situación respecto a si las IDAs aconsejadas se cumplen o no y por lo tanto no se asegura la inocuidad

de los alimentos consumidos por la población. El problema mayor estriba en que se consumen diversos alimentos con diferentes niveles de pesticidas y poco se sabe del efecto sumatorio que estos pueden tener sobre la salud humana. Como la exposición a estos compuestos es diferencial, poco sabemos del peligro o riesgo que significan para la salud. Es de hacer notar que los LMRs se fijan para cada combinación pesticida/ alimento pero muy poco se conoce sobre el efecto que pueden tener las asociaciones que frecuentemente se encuentran en un alimento, como por ejemplo un insecticida + un fungicida u otras combinaciones posibles. A modo de ejemplo, las frutillas figuran entre las 10 frutas y hortalizas con mayor cantidad de residuos por muestra en Estados Unidos, habiéndose detectado muestras que contenían residuos de 22 principios activos distintos. Desde un punto de vista toxicológico, se vuelve muy difícil evaluar el posible efecto que este tipo de combinaciones puedan tener sobre la salud. ¿Es aditivo? ¿Es sinérgico? ¿antagónico? El riesgo que plantea cualquier evento se mide como una probabilidad de la exposición a ese peligro: $R = \text{Exposición} \times \text{peligro}$. Obsérvese que grandes exposiciones a pequeños peligros significa un riesgo grande y pequeñas exposiciones a peligros considerables conllevan un riesgo relativamente menor. Si bien el peligro lo conocemos a través de los LMRs, la exposición debe calcularse haciendo estimaciones a partir de datos experimentales. El presente proyecto planteó hacer una evaluación de riesgo primaria de la exposición a pesticidas de la población uruguaya a partir de datos de monitoreo de los residuos de pesticidas en alimentos consumidos por la población uruguaya, en base a la dieta del Instituto Nacional de Alimentación. En Uruguay hay registrados 233 principios activos, los cuales se usan de manera diferencial y con distinta intensidad. Su análisis implica dos estrategias metodológicas, aquellas que permiten la determinación del mayor número de pesticidas, las llamadas Metodologías Multiresiduo (MRM) y aquellas que, debido a las características fisicoquímicas de las moléculas deben analizarse una a una. Actualmente se tiende a desarrollar preparaciones de muestra miniaturizadas, de fácil automatización, buscando disminuir las cantidades de disolventes orgánicos empleados eligiendo, en caso de ser posible, las alternativas menos tóxicas tanto para el analista como para el ambiente [6][7][8]. Las metodologías multiresiduos más utilizadas para el análisis de residuos de pesticidas en alimentos son los métodos QuEChERS y Acetato de etilo. QuEChERS, (en inglés de Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe,) fue desarrollado por Anastassiades y col. en 2003 extendiéndose a numerosas matrices y pesticidas. Nuestro grupo de trabajo ha desarrollado y validado numerosas metodologías basadas en este protocolo para alimentos; cereales, frutas y hortalizas, etc, y fue la base para evaluar metodologías aplicadas a analitos y matrices del estudio. . El método de acetato de etilo con modificaciones ha sido validado en matrices cárnicas y cítricas por nuestro grupo. Los compuestos serán analizados mediante cromatografía gaseosa o líquida acoplada a espectrometría de masas, en función de sus propiedades fisicoquímicas en modo Multiple Reaction Monitoring, usando el analizador en modo triple cuadrupolo. Las metodologías analíticas deben ser reproducibles y robustas. Para esto se deben seguir las recomendaciones de guías analíticas específicas, como la guía SANTE de la Unión Europea. El seguir estas normas y conceptos asegura que las metodologías empleadas pueden ser replicadas en cualquier parte del mundo, por cualquier laboratorio especializado y obtener resultados comparables. Los métodos deben validarse siguiendo estas guías, asegurando veracidad y exactitud, chequeando su reproducibilidad y repetitividad en diversas condiciones experimentales. Esto se logra mediante un sistema de aseguramiento de calidad y control de calidad continua (QA/QC), tal como lo estipulan las guías.

Se plantea entonces, empleando la experiencia del grupo GACT, que se desarrolló durante los últimos 10 años, el análisis sistemático y estacional de muestras de alimentos consumidos por la población para obtener una visión holística al monitorear la exposición a residuos de pesticidas de la población por un periodo de dos años. Se debe analizar un número significativo de muestras, de distinto origen y considerar su variación con la estacionalidad. Estos datos servirán de base para la realización de estudios de riesgo probabilístico de la exposición a pesticidas en Uruguay.

Un dato por demás interesante es estudiar la transferencia de los pesticidas a los alimentos procesados. En ese marco, si bien las frutas y hortalizas se consumen muchas de ellas "in natura", otras como las legumbres deben ser cocinadas antes de consumirlas. En ese marco, la posibilidad de estudiar la dinámica de pesticidas a través del procesamiento es no solo novedoso sino un aporte a la real exposición a pesticidas de la población

Al comienzo del proyecto, se plantearon las siguiente hipótesis:

Hipótesis 1- El contenido de pesticidas en los alimentos de la dieta uruguaya cumple con los criterios de inocuidad alimentaria.

Hipótesis 2- Es posible un análisis exhaustivo de los posibles residuos de pesticidas en alimentos.

Hipótesis 3- Es posible realizar un análisis de riesgo primario de la exposición a pesticidas de la población uruguaya.

La ejecución del proyecto se vio signada por la pandemia. Esto ocasionó una serie de retrasos en la ejecución del mismo. Los métodos que se pensaban desarrollar in extenso y aplicar sobre las muestras que se iban analizando, no fue posible hacerlo. Fue necesario hacer una redefinición de objetivos y del plan de trabajo. Este es el caso del análisis de ditiocarbamatos. que es el objeto de continuación de la tesis de doctorado de Natalia Gerez. Al mismo tiempo, los servicios técnicos de los equipos se retrasaron, y con eso su puesta en marcha, al sufrir continuos desperfectos. Equipos que estaban planificados de ser instalados a mediados del 2020 recién a fines de ese año, fue posible su ajuste final. Esto obligó por ejemplo a que las muestras de frutas y hortalizas fueran analizadas exclusivamente por GC-MS/MS

Metodología/Diseño del estudio

Este proyecto pretende abarcar muestras relevantes para la dieta uruguaya por lo que se seleccionaron los alimentos basados en el estudio. En el año 2017 se inició una campaña promovida por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) y la Comisión Administradora del Mercado Modelo (Camm) llamado "Canasta Inteligente". En esta propuesta se apunta a incrementar la venta de los pequeños productores de granja y a generar un cambio cultural en la población buscando un mayor cuidado de la salud a través de una alimentación balanceada y nutritiva empleando productos de estación y al mismo momento que la población tome provecho económico del precio por estacionalidad. Al fomentar el consumo de una alimentación saludable basada en frutas y hortalizas se hace necesario un control de los residuos de plaguicidas presentes en estos alimentos para asegurarle al consumidor la inocuidad de estos.

Las primeras actividades desarrolladas fueron la selección de pesticidas y matrices a estudiar para continuar luego con el ajuste metodológico y la validación en las matrices representativas (frutas, hortalizas, cereales, entre otros) de los métodos multiresiduos o monoresiduos según corresponda para los compuestos seleccionados. Las muestras para este desarrollo se obtendrán de productores orgánicos.

- Relevamiento de información de fitosanitarios en el mercado uruguayo

Se realizó el relevamiento de fitosanitarios importados empleando información estadística provista por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) y la Guía SATA, elaborando una lista de productos activos-cultivos asociados.

- Selección de las matrices de trabajo y muestreo:

Con el fin de obtener datos experimentales de concentraciones de plaguicidas en las frutas y verduras de mayor consumo a nivel local, se propone la realización de un monitoreo. Para la selección de las matrices de trabajo, se empleó la categorización usada por el Codex Alimentarius, subdividiendo los alimentos según su contenido de agua, acidez, azúcares, etc., seleccionando frutas y hortalizas representativas dentro de cada categoría para las validaciones.

Además, la selección se basó en la oferta tanto estacional como anual de frutas y verduras para consumo local. Ese relevamiento se realizó empleando datos del Mercado Modelo correspondiente a la "Canasta Inteligente" donde la selección de frutas se realiza de forma quincenal desde julio de 2017.

Las matrices trabajadas fueron: cebolla (blanca y morada), naranja, mandarina, manzana (Royal Gala, Pink Lady), tomate (americano y perita), zanahoria, zapallito, zucchini, berenjena y uvas. Se realizó un muestreo en diferentes puestos de frutas de comercios locales en diferentes estaciones del año, verano 2020, otoño 2021, invierno 2021, primavera 2021, verano 2022, invierno, primavera y otoño 2022. Para la realización del monitoreo estacional, se decidió muestrear al menos una fruta y una verdura representativa de la estación (ejemplo, naranjas en invierno) y, además, una fruta u hortaliza cuyo consumo y oferta fuera relativamente constante a lo largo del año (por ejemplo, las cebollas). Se muestrearon fruterías y verdulerías de Montevideo. Para cada una de las matrices se compró entre 1.5-2kg de ellas. Se tomaron 5 muestras por tipo de alimento considerando su estacionalidad y frecuencia en el mercado. Las muestras, consideradas genuinas, fueron subdivididas empleando el método de cuarteo para obtener de esta forma, un muestreo representativo. Las frutillas se adquirieron en puntos de venta del mercado local de Montevideo, San José, Paysandú y Salto. Las muestras de legumbres y leche fueron tomadas de grandes superficies de diferentes marcas. Las muestras fueron codificadas y procesadas rápidamente con nitrógeno líquido previo a su conservación en freezer antes del análisis químico.

- Selección de los pesticidas a analizar

Se decidió tomar una única lista de analitos para todas las matrices del estudio. En función de la disponibilidad de estándares del Grupo de Análisis de Compuestos Traza, se elaboraron con los analitos seleccionados soluciones estándares a 2000 mgL⁻¹ (soluciones madre) y soluciones stock empleadas posteriormente para el ajuste instrumental en los dos sistemas cromatográficos complementarios que se utilizan de rutina en el análisis de residuos en función de sus propiedades fisicoquímicas. Esta selección totaliza 157 analitos e incluye todos los pesticidas analizables por GC-MS/MS, un total de 96 pesticidas. Se seleccionaron además un grupo de 61 pesticidas a ser analizados por LC-MS/MS. Esta parte del estudio no fue posible completarla por los continuos desperfectos del equipo de cromatografía líquida que no permitió un trabajo continuo ni sistemático. Adicionalmente, las limitaciones de trabajo presencial debidas a la pandemia no permitieron un trabajo constante en el ajuste de las condiciones analíticas, por lo que el estudio se centró en compuestos analizables por GC-MS/MS.

*Análisis químico

Para la determinación de los compuestos de interés en las diferentes matrices se compararon y/o adaptaron diferentes metodologías analíticas cumpliendo con los parámetros analíticos fijados por las normativas internacionales. Posteriormente se validaron los métodos según la guía Sante de la Unión Europea (SANTE 2017).

Para la validación, se utilizó el concepto de matrices representativas del documento SANTE (alto o bajo contenido en agua, grasas, ácidos, almidón, etc). De esta forma se desarrollaron y validaron 14 metodologías analíticas multiresiduos. En el caso de cereales no se ha obtenido una metodología adecuada para el análisis de glifosato, luego de su ajuste en el Cromatógrafo

Iónico acoplado a triple cuadrupolo, es necesario un trabajo más exhaustivo en esta matriz específica cuya composición es compleja.

Los compuestos fueron analizados mediante cromatografía gaseosa o líquida acoplada a espectrometría de masas en función de sus propiedades fisicoquímicas en modo de Multiple Reaction Monitoring, usando el analizador en modo triple cuadrupolo. Se optimizaron los métodos cromatográficos y las condiciones de los espectrómetros de masas; (en HPLC-MS/MS las condiciones de la fuente de ionización y las transiciones a ser monitoreadas para cada uno de los compuestos, junto con los parámetros óptimos de voltaje de fragmentación y energía de colisión. Para GC-QqQ/MS se optimizarán las transiciones características y sus correspondientes energías de colisión).

-Selección del método de preparación de muestras

Como método de preparación de muestra se seleccionó el QuEChERS AOAC 2007.01. El método QuEChERS desarrollado en conjunto por Anastassiades y Lehotay en 2003 es considerado un método de referencia para el análisis multiresiduo de contaminantes orgánicos ya que brinda la posibilidad de realizar en una sola extracción la determinación de muchas familias de compuestos en dos sistemas instrumentales complementarios (GC y LC acoplados a detectores de espectrometría de masas). El método AOAC realiza un control del pH del extracto a través del uso de un par Buffer AcOH/AcONa, lo que es particularmente positivo para optimizar la extracción de los analitos sensibles al pH. Se realizaron las variaciones correspondientes en el tipo y cantidad de sales de clean up según las características de los componentes de las matrices en estudio. El Cromatógrafo de gases empleado es un GC-2010 acoplado a un detector de triple cuadrupolo (TQ8050), ambos de SHIMADZU. Para todos los casos se trabajó en modo de monitoreo de reacciones múltiples (MRM) empleando como soporte para el ajuste de los métodos de adquisición la base de datos Smart Pesticide Database (Restek®).

-Validación de las metodologías analíticas

Pese a emplear un método considerado de referencia, el mismo debe ser validado en las condiciones del laboratorio en el que se lleva a cabo con los instrumentos de medidas que se tengan a disposición y con cada matriz definida. Para ello, se siguieron los lineamientos del documento SANTE [9]. Se estudió veracidad, precisión, linealidad y efecto matriz para las frutas y hortalizas seleccionadas

- Análisis de muestras reales

Para la preparación de muestra, se empleó el método validado para cada matriz del estudio (o matriz representativa del grupo según la definición de Codex) y el sistema instrumental optimizado previamente. Cada muestra se realizó por duplicado para tener un coeficiente de variación asociado, se llevaron a cabo controles de calidad en cada batch de extracción. Las cuantificaciones en todos los casos se realizaron empleando curvas de calibración en matriz siguiendo los lineamientos de identificación y confirmación de los positivos establecidos en el Documento SANTE vigente.

Para el caso de las legumbres, leches y arroz, se desarrollaron los siguientes metodologías de preparación de muestras adaptadas según su composición la cual es muy diferente de Frutas y hortalizas.

Las matrices estudiadas fueron leche de vaca, lentejas, garbanzos, porotos manteca y arroz parboiled. Los plaguicidas seleccionados para su evaluación se definieron de acuerdo a las Buenas Prácticas Agrícolas, los referidos en la Guía SATA y los positivos reportados en la literatura. del anexo se muestran los plaguicidas seleccionados con sus respectivos LMRs para todas las matrices.

Para leche el método utilizado parte de 10g de leche, se realiza extracción con 10 mL de acetonitrilo con 1% de ácido acético, se agita y se realiza salting out con 4g de sulfato de magnesio (MgSO₄) y acetato de sodio (AcONa), se centrifugó. Se tomaron 4 mL de la fase orgánica y se realizó clean up con 600 mg de MgSO₄, 200 mg de RPC18 y 200 mg de amina primaria/ secundaria (PSA), se toma 1 mL y se filtra a un vial de autosampler para su inyección en HPLC-MS/MS. Para inyectar en GC-MS/MS se tomaron 2 mL y se evaporan a sequedad. Luego, se retomó el residuo en 1mL de acetato de etilo calidad HPLC, se sonicó, se filtró y se transfirió a un vial de autosampler.

En cuanto a legumbres se probaron un total de siete métodos de extracción para lentejas, cuatro para garbanzos y uno para porotos, entre ellos SweEt y QuEChERS con variaciones. Nuevamente, el método seleccionado para todas las matrices, fue el QuEChERS AOAC 2007.01 modificando la cantidad de sulfato de magnesio utilizado en el salting out. Previo a las extracciones, cada matriz se procesó con un molinillo de café y se homogeneizó. La metodología final parte de 5g de muestra seca, se hidrata con 10 mL de agua. Se agregaron 15 mL de ácido acético al 1% en acetonitrilo, se agita y se realiza salting out con MgSO₄, cloruro de sodio (NaCl) y AcONa para lentejas, en el caso de garbanzos y porotos se varió la proporción de MgSO₄ y de NaCl y se centrifugó. Se tomaron 4 mL de la fase orgánica y se realiza clean up con 600 mg de MgSO₄ y 200 mg de PSA, se toma 1mL y se filtra a un vial de autosampler para su inyección en HPLC-MS/MS. Para inyectar en GC-MS/MS se tomaron 2 mL y se evaporan a sequedad. Se retomó el residuo en 1 mL de acetato de etilo calidad HPLC, se sonicó, se filtró y se transfirió a un vial de autosampler.

Para arroz parboiled se parte de 5g de muestra seca previamente molida y homogeneizada, y se hidrata con 10 mL de agua. Se agregaron 10 mL de ácido acético al 1% en acetonitrilo, se agita y se realiza el salting out con MgSO₄, NaCl y AcONa; y se

centrifuga. Se toman 4 mL de la fase orgánica y se realiza el clean up con 600 mg de MgSO₄ y 200 mg de PSA, se toman 2 mL y se evaporan a sequedad. Se retomó el residuo en 1 mL de acetato de etilo calidad HPLC, se sonicó, se filtró y se transfirió a un vial de autosampler. Para el caso de arroz parboiled los análisis se realizaron únicamente mediante GC-MS/MS

-Evaluación de riesgo

Se realizó la evaluación de riesgos de exposición a los pesticidas empleando aproximación top up. Si bien la evaluación en base a datos reales que se detecten en las muestras de alimentos que se analicen durante el proyecto estaba planeada no fue posible realizarla, ya que se completó el último monitoreo al finalizar el proyecto. Estaba planeado, para esta última aproximación, considerar la ruta de exposición (oral), la duración (toda la vida), la cantidad de pesticidas (concentraciones determinadas experimentalmente), la frecuencia de consumo (según datos de MSP) en la población de estudio (niños y adultos), para luego realizar la caracterización del riesgo. Para esto se realiza la búsqueda de los valores toxicológicos de referencia para cada residuo que se detecte y la evaluación de los estudios donde se derivan los mismos.

Para la aproximación top up se tomaron como caso de estudio los LMRs de cada par de pesticida/alimento fijados por la reglamentación para un pesticida por ej. clorpirifos y diazinon y ditiocarbamatos. Se considera que sucede si todos los alimentos, consumidos en la fracción de la dieta que corresponde, contienen los residuos del pesticida al nivel del LMR. La suma total de estos residuos, debe estar por debajo de la ingesta diaria admisible

Resultados, análisis y discusión

De un total de 233 fitosanitarios registrados en Uruguay, el 44% corresponde a herbicidas, el 31% a insecticidas y el 25% a fungicidas. Esta tesis plantea el monitoreo de casi el 67% de los activos registrados actualmente lo que posibilita crear un escenario bastante realista en cuanto a los hallazgos en muestras comerciales.

Luego de concluida la optimización de los analitos se inició el diseño del plan de validación de las matrices de interés siguiendo los lineamientos del documento SANTE donde se estudiaron las cifras de mérito que se detallan en la tabla de la sección experimental.

-Validación de las metodologías analíticas:

Es de resaltar que el Codex Alimentarius da una lista positiva de los límites máximos de residuos de plaguicidas para cada combinación matriz-analito, y todos aquellos que no se incluyen en ella no están permitidos. En cambio, la Unión Europea adopta un criterio precaucional y fija un límite máximo de 0,01 mg kg⁻¹ para aquellos pesticidas para los que no está aprobado su uso en esa matriz específica. Como es relevante el estudio de posibles desviaciones de uso que atenten contra la salud de los consumidores y es necesario fijar los límites de cuantificación del método globalmente, se tomó como objetivo estudiar como nivel mínimo de cuantificación 0,01 mg kg⁻¹.

Límites de cuantificación (LOQ): Para el 92% de los analitos ensayados, en las matrices estudiadas, el LOQ coincide con el nivel más bajo de recuperación ensayado (0,01 mg kg⁻¹) en las condiciones que establece SANTE. Se observó particular dificultad en compuestos organoclorados como endosulfan alfa, endosulfan beta, dicofol y oxifluorfenol en matrices como naranja, tomate y uva. Ninguno de estos analitos fue hallado como positivo en los posteriores muestreos estacionales.

Efecto matriz: Para todos los analitos, en todas las matrices evaluadas, el efecto matriz fue entre medio-alto, es decir, fue superior al 20% por lo que todas las cuantificaciones se realizaron empleando las curvas de calibración en matriz. Además, se observó un incremento de la señal para la mayoría de los analitos con respecto a la pendiente de la curva de calibración en disolvente. Ese hecho reafirma la decisión de realizar todas las cuantificaciones empleando las curvas de calibración en matriz ya que, de otro modo, se estarían realizando sobre o sub-cuantificaciones.

Linealidad: Se construyeron todas las curvas de calibración, en matriz y en disolvente para realizar un análisis de linealidad de ambas y el estudio de regresión. Para todos los casos se observó tendencia lineal (modelo de primer orden) obteniendo coeficientes de determinación superiores a 0.99, con back calculated concentrations (BCC's), <20%. El rango lineal, de la mayoría de los analitos estudiados fue 5-250 µg kg⁻¹. Se observó que algunos analitos presentaban siempre un rango lineal más acotado (10-250 y 50-250 µg kg⁻¹), por ejemplo: endosulfan alfa, endosulfan beta, aldrin, dieldrin, endrin.

Precisión: La precisión de los resultados se ve reflejado en la desviación estándar relativa expresada en forma porcentual. Se realizaron para todos los casos, ensayos de recuperación a todos los niveles de forma inter-día. Los resultados mostraron que la performance del método es poco dispersa. Para todos los casos, tanto en condiciones de repetibilidad como de reproducibilidad intermedia, los RSD's son menores o iguales al 18%.

Veracidad: Para todas las matrices estudiadas hasta el momento se realizaron los cálculos de recuperación a tres concentraciones diferentes (10; 20 y 200 µg kg⁻¹) en dos días de trabajo distintos. Se cumplió el criterio de aceptación de para al menos dos de los tres niveles de concentración ensayados.

Exactitud: Se colectaron los datos de los controles de calidad (QA/QC) realizados en cada matriz monitoreada. Esos controles de calidad continuos "on-going" eran recuperaciones al nivel del LOQ. En todos los casos, se comparó el valor obtenido al

momento del monitoreo con los valores obtenidos en la validación de la metodología, no observándose diferencias significativas entre ellos.

-Hallazgos del Monitoreo estacional de frutas y hortalizas.

Se realizaron los análisis de las frutas y verduras compradas en cada estación con los métodos desarrollados y validados previamente utilizando GC-MS/MS.

Se analizaron 320 muestras correspondientes a las matrices seleccionadas, realizándose un monitoreo de entre 57-80 plaguicidas individuales en cada una de ellas. Las matrices analizadas presentan diferente grado de dificultad, destacándose las matrices cítricas y las cebollas como matrices extremadamente difíciles, ya sea por el número de co-extractivos, o por el medio ácido, entre otros factores. Los co-extractivos otorgaron un efecto protector, en el GC-MS/MS, disminuyendo la degradación de los analitos en el inyector. Esto se tradujo en un efecto matriz positivo que permitió lograr niveles de cuantificación más bajos.

Los positivos fueron identificados y confirmados siguiendo los requisitos de SANTE donde se verificó para cada caso que se cumplieran tanto los requerimientos de cromatografía como los de espectrometría de masas.

-Resultados del monitoreo

Se detectaron 27 principios activos entre todas las frutas y hortalizas estudiadas, de los cuales 18 son fungicidas que representan el 70%. El restante 30% de los detectados corresponde a insecticidas. (ADJUNTO 1) Todos los compuestos están aprobados para su uso en Uruguay. Se detectaron desviaciones de los LMR, fundamentalmente para el clorpirifos y la procimidona. Esta última no está contemplada en la reglamentación CODEX para el uso en ninguna de las matrices donde se la detectó

En el adjunto 1 se observa que, de acuerdo a los presentes resultados, en las muestras de tomate y uva, seguidos por los de zapallitos y frutillas es donde se encontró la mayor cantidad de principios activos diferentes. En el caso de los cítricos, se detectaron los fungicidas de poscosecha que se emplean habitualmente en los tratamientos de packing. En el caso del tomate y las uvas, no se detectaron los 11 principios simultáneamente sino que se encontraron diferentes combinaciones de los mismos y, al igual que en el caso de la frutilla, todas las muestras contenían al menos un pesticida. Las frutillas tuvieron 5 principios activos de promedio en todas las muestras, donde propamocarb y carbendazim estuvieron por encima del LMRs de Codex en muchas de ellas. (ADJUNTO 2) En cuanto a los pesticidas encontrados, los insecticidas fueron todos insecticidas de contacto, con acción sobre el sistema nervioso central y de diferente toxicidad para humanos. Los de mayor toxicidad fueron organofosforados, carbamatos y los de menor toxicidad los piretroides y el spinosad. También fue un hallazgo frecuente pesticidas que actúan sobre sistemas metabólicos específicos de los insectos, de baja toxicidad para mamíferos como piriproxifen.

Los principios activos más empleados fueron los fungicidas azoxystrobin, procimidona, pirimetanil junto con los insecticidas clorpirifos y piriproxifen que fueron encontrados en 4 de las frutas y hortalizas estudiadas.

En adición a las frutas y hortalizas más comunes estudiadas en todos los muestreos, se estudiaron otras con menor frecuencia, como por ejemplo zanahorias y berenjenas donde los fungicidas fludioxinil y cipordinil fueron repetidamente detectados. Curiosamente, en los zucchini evaluados no hubo detecciones de pesticidas.

En el caso de las otras matrices estudiadas, lentejas, garbanzos, leche y arroz parboiled, no se detectaron positivos en las muestras estudiadas. Sin embargo, debería realizarse un monitoreo más amplio, incluyendo un número de muestras comerciales mayor para tener un panorama más claro sobre la ocurrencia de pesticidas en estos alimentos y poder llegar a una conclusión que lleve a alguna recomendación.

- Estimaciones de riesgo

El cálculo de la exposición dietaria crónica determinística para los residuos de plaguicidas se hizo siguiendo el procedimiento recomendado por la OMS en las "Directrices para predecir la ingesta dietaria de residuos de plaguicidas". Usando este método, la exposición dietaria crónica se estimó a través del parámetro denominado ingesta diaria teórica máxima nacional para cada plaguicida (IDTMN). Mediante la IDTMN, la ingesta dietaria de un residuo de plaguicida en un alimento dado se obtiene multiplicando el nivel de residuo en el alimento (LMR) por la cantidad consumida de ese alimento. Luego, la ingesta dietaria total del residuo de plaguicida se obtiene sumando las ingestas de todos los alimentos que contienen el residuo. Para finalizar, la caracterización del riesgo se realiza comparando la IDTMN con la IDA y considerando el peso corporal del grupo a evaluar, a través del cálculo del parámetro %IDA. En este caso de estudio, se tomaron pesos corporales (Bw) de 60 kilogramos y no se realizaron distinciones entre hombres y mujeres. El valor de consumo es el hallado en la Encuesta Nacional de Hogares.

Como se puede ver en el análisis de Ditiocarbamatos, (ADJUNTO 3) los resultados variaron dependiendo del activo, aunque se trabaje dentro de la misma familia. Pese a que el valor de IDTMN es similar para Ziram y Mancozeb, al ser sensiblemente más bajo el valor de IDA del Ziram (un orden de magnitud menor), se refleja un valor de IDA muchísimo mayor.

• Mancozeb: IDTMN: 0,81 %IDA: 26,9.

- Ziram: IDTMN: 0,77 %IDA: 213,3

En el análisis de los Organofosforados tomados como caso de estudio, se puede observar un comportamiento similar para Malatión y Clorpirifos. El valor de IDA para Clorpirifos es un orden de magnitud menor al de Malatión, lo que se refleja en el valor final calculado

- Malation: IDTMN: 0,06 %IDA: 2,15.
- Clorpirifós: IDTMN: 0,05 %IDA: 92,02.

Cabe destacar que cuando el valor de IDA supera al 100% es decir, el valor de IDTMN supera al valor de IDA es necesario aplicar alguna corrección como, por ejemplo, factores de procesamiento, porción comestible, entre otros para poder refinar los cálculos y sacar una conclusión sobre la aceptabilidad o no de los límites actuales. De todas formas, la cercana al 100% como en el caso del clorpirifos, obliga a considerar la necesidad de un ajuste global en los LMRs para ese pesticida.

En particular, el clorpirifos ha sido prohibido en la Unión Europea por la toxicidad de sus productos de degradación. Si bien los tiempos de espera para el mancozeb toman en consideración la degradación del compuesto y su metabolito tóxico etilen tiourea, en este cálculo no se considera la toxicidad de este último, el que representa mayores riesgos para la salud por ser un reconocido teratogénico.

Conclusiones y recomendaciones

Dado que las frutas y hortalizas se consumen mayoritariamente "in natura" el contenido de residuos de pesticidas en ellas es crítico cuando se considera la inocuidad de los alimentos que se consumen. Como primer paso para conocer las situación nacional, se han validado metodologías analíticas para 15 matrices representativas (frutas y hortalizas, legumbres, leche pasteurizada y arroz) y se realizó un monitoreo estacional de residuos de plaguicidas de dos años, siguiendo básicamente la oferta de la canasta inteligente de la UAM mas un monitoreo a nivel nacional de la ocurrencia de residuos en muestras de frutillas. De los pesticidas monitoreados se detectaron 27 principios activos, fungicidas e insecticidas en las distintas matrices. Hay cultivos en los que consistentemente se emplean distintos principios activos, como en tomates, uvas y frutillas. Sin embargo se hace evidente la necesidad de un monitoreo más amplio y exhaustivo, que asegure la inocuidad de las frutas y hortalizas que se consumen, así como la de legumbres donde el universo de muestras debe ampliarse para tener más datos.

El presente proyecto planteaba una serie de matrices más ambiciosa de la que finalmente se pudo completar. Las restricciones que impuso la pandemia limitaron el alcance del proyecto. De todas formas, ha quedado claro que no es una tarea que pueda completarse en dos años y esto es solo una muestra del trabajo a realizar para asegurar la inocuidad de los alimentos que se consumen en Uruguay. Se ha monitoreado la producción nacional básicamente, pero la actual globalización nos obliga a pensar que otros principios activos pueden usarse en los países de origen de frutas y hortalizas ya no tan exóticas sino que se consumen en el país como mango, papaya, palta, mandioca entre otras. Por lo tanto, la estimación de la inocuidad de los alimentos, considerando los cambios que están ocurriendo en la dieta uruguaya deben considerarse como parte de un universo siempre cambiante.

No fue posible completar el desarrollo del análisis de glifosato en cereales e implementar la determinación de ditiocarbamatos así como el análisis exhaustivo de muestras de yerba mate, como alimentos interrogantes de la dieta nacional, donde estudios previos habían confirmado la presencia de residuos de pesticidas. Esta es una tarea que se continúa a pesar de la finalización del proyecto ya que en este momento se está encarando la puesta a punto del análisis de ditiocarbamatos, como parte de la tesis de doctorado de Natalia Gerez, quien cuenta con una beca ANII para ello Y con el glifosato y su metabolito AMPA ajustados instrumentalmente para ser determinados con un cromatógrafo iónico acoplado a masas en tándem, adquirido recientemente por el grupo, solo resta el desarrollo del método de preparación de muestra.

De los cálculos realizados, si bien el empleo del IDTMN suele sobreestimar la exposición y plantearse en el peor escenario posible (concentraciones halladas en los alimentos al nivel de concentración del límite máximo de residuos) permite una aproximación válida con poca cantidad de información empleando un modelo sencillo, aprobado internacionalmente para su uso y de fácil interpretación. Se destaca la importancia del estudio de la ocurrencia de plaguicidas en los alimentos ya que su presencia puede representar un riesgo para la salud del consumidor.

Por último, los resultados de este proyecto son sólo una instantánea incompleta acerca de la presencia de residuos de pesticidas en alimentos en nuestro país. Es necesario profundizar y ampliar la base de datos para poder diseñar políticas de inocuidad alimentaria adecuadas a las necesidades y a la dieta de la población uruguaya.

Referencias bibliográficas

- Anastassiades, M.; Kolberg, D. I.; Benkenstein, A.; Eichhorn, E.; Zechmann, S.; Mack, D.; Wildgrube, C.; Sigalov, I.; Dörk, D.; Barth, A. 2016. Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in foods of plant origin via LC-MS/MS involving simultaneous extraction with methanol (QuPPE-Method) - Version 9. Document History. pp 65.
- BESIL, N , CESIO M.V. , Luque, E. , Pintos, P. , Rivas, F. , HEINZEN, H (2018) Dissipation of Pre-Harvest Pesticides on Clementine Mandarins after Open Field Application, and Their Persistence When Stored under Conventional Postharvest Conditions. *Horticulturae*, v.: 4 p.:55 – 70.
- BESIL, N , Rezende, S. , Alonzo, N. , CESIO M.V. , Rivas, F. , HEINZEN, H, (2019) Analytical methods for the routinely evaluation of pesticide residues in lemon fruits and by products. *Springer Nature Applied Sciences*, v.: 1 p.:618
- BESIL, N , PÉREZ-PARADA A. , Bologna, F. , CESIO M.V. , Rivas, F. , HEINZEN, H (2019) Dissipation of selected insecticides and fungicides applied during pre-harvest on mandarin and orange trees in Uruguay. *Scientia Horticulturae*, v.: 248 p.:34 – 40.
- Boon et al 2008 *Oikos*, 117 (3) 1321-1328 <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2008.16567.x>
- Finizio. A; Villa. S “Environmental risk assessment for pesticides: A tool for decision making” *Environmental Impact Assessment Review*, 22, 235–248. 2002
- Organización Mundial de la salud (OMS) “Residuos de plaguicidas en alimentos”. Disponible en línea: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food>. Accedido 29/05/2019.
- Codex Alimentarius, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO-OMS). “Residuos de plaguicidas en alimentos y piensos”, Disponible en línea: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/es/>. 2017. Accedido 29/05/2019.
- Canasta Inteligente (Mercado Modelo) Comisión Administradora del mercado Modelo (CAAM). Disponible en línea: <http://mercadomodelo.net/canasta-inteligente>. Accedido 27/05/2019.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (FAO) “Análisis de riesgos relativos a la inocuidad de los alimentos”. Disponible en línea: <http://www.fao.org/3/a0822s/a0822s00.htm>
- Anastassiades M; Lehotay SJ; et al. “Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce”. *Journal of AOAC International*, 86(2): 412-431. 2003
- Lehotay SJ, Maštovská K, Lightfield AR. “Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables”. *Journal of AOAC International*, 88(2): 615-629. 2005.
- M. Anastassiades et al., “Quick Method for the Analysis of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS/MS involving Simultaneous Extraction with Methanol (QuPPE-Method). Version 9.3.,” 2017. Disponible en línea: http://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPPE-PO_EurlSRM.pdf.
- European Commission Directorate-General for Health and Food Safety. 2017. “Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed” (Document SANTE/11813/2017) Disponible en línea: http://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945.pdf. Accedido 18/05/2020.

Licenciamiento

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)