



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS  
ORGANOFOSFORADOS EN FRUTAS POMÁCEAS POR  
MEDIO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y  
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**EVA MARINA BRIZ LÓPEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: I.Q.: MIGUEL ANGEL HIDALGO TORRES**

**VOCAL: M.C.: LUCIA CORNEJO BARRERA**

**SECRETARIO: Dr.: PANDIYAN THANGARASU**

**1er. SUPLENTE: Dra.: ILIANA ELVIRA GONZALEZ HERNANDEZ**

**2° SUPLENTE: Dra.: HILDA ELIZABETH CALDERON VILLAGOME**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 114 EDIFICIO F. FACULTAD DE QUÍMICA.  
CIUDAD UNIVERSITARIA.**

**ASESOR DEL TEMA: DR. PANDIYAN THANGARASU** \_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. HILDA E. CALDERON VILLAGÓMEZ** \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE: EVA MARINA BRIZ LÓPEZ** \_\_\_\_\_

# ÍNDICE

---

<b>No.</b>	<b>Tema</b>	<b>Página</b>
	Agradecimientos	II
	Dedicatoria	III
	Índice general	IV
	Resumen	VII
	Introducción	1
I.	Antecedentes	3
1.1	Clasificación de los plaguicidas	5
1.1.1	Clasificación por función	5
1.1.2	Según su toxicidad	6
1.1.3	Según su naturaleza química	7
1.2	Usos de los plaguicidas	8
1.2.1	Uso agrícola y forestal	8
1.2.2	Uso pecuario	8
1.2.3	Uso en la salud pública	8
1.3	Contaminación por plaguicidas	9
1.4	Plaguicidas organofosforados	11
1.4.1	Toxicidad	12
1.4.2	Compuestos más utilizados	13
1.5	Legislación global en materia de plaguicidas	15
1.5.1	La situación en México	18
1.6	Metodología analítica para determinación de plaguicidas en muestras ambientales	21

<b>No.</b>	<b>Tema</b>	<b>Página</b>
1.7	Preparación de la muestra para la determinación de analitos orgánicos	23
A.	Muestreo	24
B.	Almacenamiento	24
C.	Extracción	25
D.	Purificación de la muestra (clean-up)	26
E.	Determinación instrumental	27
1.8	Manzana (Malus Domestica)	28
1.8.1	Origen	28
1.8.2	Morfología	29
1.8.3	Importancia nutricional	30
1.8.4	Cultivo en México	31
1.8.5	Plagas	34
1.8.6	Enfermedades	36
II.	Justificación	38
III.	Hipótesis	38
IV.	Objetivos	39
4.1	Objetivo general	39
4.2	Objetivos particulares	39
V.	Materiales	40
5.1	Muestra blanco	40
5.2	Disolventes y reactivos	40
5.3	Equipo, material e instrumentación	42
VI.	Metodología	43
6.1	Caracterización y estandarización del método	43
6.2	Muestra blanco	44

<b>No.</b>	<b>Tema</b>	<b>Página</b>
6.3	Extracción de residuos de pesticidas	45
6.4	Extracción fase sólida (SPE) o limpieza	45
6.5	Identificación y cuantificación	46
VII.	Resultados y discusión	47
7.1	Determinación de la longitud de onda óptima para la detección	47
7.2	Selección de la composición de la fase móvil	50
7.3	Caracterización	52
7.3.1	Peso molecular vs tiempo de retención	51
7.3.2	pKa vs tiempo de retención	54
7.3.3	Dureza vs tiempo de retención	57
7.3.4	Polaridad vs tiempo de retención	60
7.3.5	Estudio electroquímico	63
7.4	Validación del método analítico	66
7.4.1	Curvas de calibración de estándares	66
7.4.2	Porcentajes de recuperación de los estándares	69
7.4.3	Coefficiente de variación, límites de detección y límite de cuantificación	70
7.5	Análisis de pesticidas en manzanas	72
7.5.1	Porcentajes de recuperación	72
VIII.	Conclusiones	76
IX.	Bibliografía	77

## Resumen

La mala utilización de los plaguicidas principalmente su uso excesivo, las sobredosis, la aplicación inadecuada por los agricultores pueden ocasionar la presencia de niveles traza de residuos de plaguicidas en las frutas y hortalizas; lo anterior puede originar riesgos tanto para la salud humana como para la comercialización en los diferentes mercados mundiales. El presente estudio tiene por objeto evaluar la presencia de residuos de plaguicidas organofosforados en manzana, mediante HPLC como un método alternativo a la CG mediante la comparación de los límites de detección y cuantificación, determinando de esta forma la calidad del alimento; requisito importante dentro de convenios internacionales relacionados con la inocuidad de alimentos y su comercialización. Las muestras analizadas se obtuvieron de diferentes puntos comerciales de la Ciudad de México, eligiendo para el análisis manzanas obtenidas en el mercado de la Merced. Para la evaluación de los plaguicidas se diseña y estandariza una metodología cromatográfica multiresíduos, trabajando con muestras contaminadas artificialmente. Esta metodología se basa en la extracción de los plaguicidas con acetato de etilo, la limpieza de los mismos por medio de extracción en fase sólida (SPE), presentando una recuperación del 80 %. Esta metodología permitió determinar límites de cuantificación y límites de detección de hasta  $1 \times 10^{-1}$  ppb.

Palabras Claves: Plaguicidas organofosforados, manzanas, cromatografía de líquidos, extracción en fase sólida

# I. INTRODUCCIÓN

La producción agrícola se ha incrementado considerablemente debido a la creciente demanda que se presenta año con año. Para poder cubrir estas necesidades, se hace uso de fertilizantes y plaguicidas para preservar los cultivos. Su empleo puede evitar grandes pérdidas en la cadena de abasto de los alimentos, sin embargo, si no se hace de manera controlada puede ocasionar deterioro ambiental y graves daños a la salud humana; así los residuos de plaguicidas en suelos, agua, alimentos, aire o seres vivos aún en pequeñas concentraciones, son una forma de contaminación al ambiente y desequilibrio ecológico<sup>[1]</sup>.

Los plaguicidas son clasificados y definidos por el *Codex Alimentarius* como, “*cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción y/o almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o piensos*”<sup>[2]</sup>. El término incluye a las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de la fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra su deterioro durante el almacenamiento y transporte. El término no incluye normalmente fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios ni medicamentos para animales. El uso inadecuado de estos compuestos ha generado como consecuencia la aparición de plagas más resistentes a los plaguicidas de control. Por lo cual se requiere plaguicidas más potentes y nuevos productos, para combatir estas amenazas.

En México cada año se emplean aproximadamente 72,000 toneladas de plaguicidas<sup>[3]</sup>, para la producción y preservación agrícola (arroz, frijol, maíz, etc.), dentro de los cuales la mayoría son altamente tóxicos y persistentes en el ambiente, lo que los convierte en uno de los grupos de contaminantes más importantes. Se han detectado residuos de plaguicidas en alimentos, aguas,

suelos, organismos acuáticos, fluidos biológicos, etc.<sup>[4-7]</sup> en lugares tan remotos como la Antártica y el Ártico. Se han mencionado cifras tan impactantes, como que en algunos casos se calcula que anualmente se consume más de medio kilo de plaguicidas por persona <sup>[5]</sup>. Estos compuestos representan un peligro en varios aspectos, como en la fabricación y formulación, para el agricultor que entra en contacto con ellos, para la ecología asociada a desequilibrios en el ambiente y para el consumidor, además de requerir técnicas muy costosas para su cuantificación y caracterización. A pesar de todos los inconvenientes que plantean, difícilmente se puede prescindir de su uso en el estado actual de desarrollo de la agricultura. El riesgo que plantea su aplicación puede verse reducido considerablemente si se aplican correctamente a los cultivos para los que han sido elaborados, siguiendo las correspondientes medidas de seguridad.

Con el objetivo de proteger la salud de los consumidores y asegurar que se aplique a los alimentos la cantidad de plaguicida que realmente es necesaria para combatir las plagas, la legislación Mexicana sigue los Límites Máximos Residuales (LMR's). Los LMR's indican la cantidad máxima de residuos de plaguicidas permitidos en un determinado producto, basándose en estudios de ingesta diaria promedio de ese alimento y en la toxicidad que presente ese plaguicida en particular <sup>[8]</sup>.

Para determinar los residuos de plaguicidas en productos de cosecha tales como frutas y hortalizas, es necesario el montaje de metodologías analíticas, sensibles, reproducibles, confiables y debidamente validadas que permitan su cuantificación y determinación, para de esta forma evaluar la inocuidad y calidad de los productos que ingiere el consumidor <sup>[9-12]</sup>.

El objetivo del trabajo es la validación de la cuantificación de residuos de plaguicidas organofosforados en manzanas mediante HPLC. Se desarrolla una técnica de extracción en fase sólida (SPE), en la cual se obtengan los máximos niveles de recuperación y mayor reproducibilidad. La manzana es uno de los frutos con mayor nivel de producción y consumo en el ámbito nacional e internacional <sup>[13]</sup>, por lo cual es importante saber si este alimento se encuentra exento de residuos de pesticidas.

# I. ANTECEDENTES

Los plaguicidas han sido utilizados en cierta manera desde tiempos muy remotos <sup>[14]</sup>. El papiro de Ebers, escrito sobre el año 1550 A.C., recoge el uso de ciertos preparados “médicos o farmacéuticos” que se utilizaban para repeler insectos de las casas. Incluso Homero (1000 A.C.) menciona en la Odisea la quema de azufre para “purgar las casas, las habitaciones, etc.” (**La Odisea, Capítulo XXII**). Dioscórides, médico griego (40-90 A.C.), ya conocía las propiedades tóxicas del azufre y del arsénico. Hay evidencias de que incluso alrededor del año 900 A.C. **Los** chinos utilizaban arsenicales para eliminar insectos de los jardines. Los romanos, por su parte, utilizaban dos especies de plantas (*Veratrum álbum L.* y *V. nigrum L.*, pertenecientes a la familia de las liliáceas) como raticidas <sup>[15]</sup>.

La evidencia más antigua que se tiene en occidente del uso de plaguicidas, data de 1669, cuando se utilizaron arsenicales como insecticidas para eliminar plagas de hormigas en mieles. Por otro lado, el uso de compuestos de cobre como fungicidas se conoce desde 1807, mientras que el ácido cianhídrico, ya conocido por egipcios y romanos fue utilizado a partir de 1877 para fumigar los museos que guardaban colecciones de insectos <sup>[15]</sup>.

Hasta mediados de los años treinta, los plaguicidas utilizados eran de origen natural o bien compuestos inorgánicos. El tabaco (nicotina) fue y todavía es utilizado en muchos países como insecticida; el azufre, por ejemplo, se empezó a utilizar con frecuencia a principios del siglo XIX, época en la que ya se conocían sus propiedades como pesticidas y, a pesar de la aparición de pesticidas organosulfurados como el Captan u otros a finales de la década de los 50, todavía hoy es utilizado con frecuencia dada su baja toxicidad comparada con otro tipo de compuestos. El cloruro de mercurio fue ampliamente utilizado como fungicida a partir de 1891 y fue poco a poco reemplazado por formas mercuriales orgánicas como el fenilmercurio (1915), alquiloalquilmercurio (década de los 20) y alquilmercurio (década de los 40). Los graves envenenamientos acaecidos en lugares como Irak en 1971 por el

consumo de cereales que contenían estos productos, hicieron que se prohibiera su uso <sup>[14]</sup>.

Los primeros plaguicidas obtenidos a partir de síntesis orgánica aparecieron a principios de la década de los 30 y contenían grupos nitrogenados y tiocianatos. Entre 1935 y 1950 aparecieron los pesticidas organoclorados, entre los que se encuentra el DDT que, aunque fue sintetizado por Zeidler en 1874, no fue hasta 1939 cuando el Dr. Paul Muller descubrió su uso como insecticida, por el que le dieron el premio Nobel de medicina en 1948. Desde entonces el DDT fue ampliamente utilizado para eliminación de plagas y fue de gran utilidad para erradicar enfermedades como el tifus o la malaria en muchos países <sup>[14]</sup>. Con la aparición de la cromatografía de gases en 1962, se pudo comprobar la presencia de residuos de plaguicidas clorados en toda la superficie terrestre, sobre todo de DDT, de ahí que a partir de 1970 diversos países hayan prohibido o restringido su uso, debido a su alta persistencia, su capacidad de acumulación en tejidos grasos y su alta toxicidad, aunque todavía hoy se encuentran restos de DDT en muestras de diversa índole. En México existen algunos organoclorados que todavía se comercializan como el DDT, el *metoxicloro* y el *lindano* <sup>[16]</sup>.

Por otro lado, entre 1940 y 1970 aparecieron los compuestos organofosforados y los carbamatos, que presentan menor persistencia ambiental que los anteriores y que han sido utilizados hasta nuestros días. Quizás, el grupo de pesticidas más importante de reciente introducción sean los piretroles o piretrinas sintéticos, muchos de los cuales se encuentran de forma natural, presentes en las flores de los crisantemos y otros <sup>[17]</sup>.

Aunque hasta el momento son muchas las familias de plaguicidas existentes, se están desarrollando los denominados *biopesticida* o pesticidas bioquímicos que son sustancias naturales (de origen animal o vegetal, bacterias, minerales, etc.) capaces de controlar plagas por mecanismos que no implican una vía tóxica como los anteriores. En este grupo de compuestos se incluyen las feromonas que son utilizadas para atraer insectos hacia trampas adecuadas. Debido a la dificultad existente para poder asegurar que un determinado producto es efectivamente un *biopesticida*, la Agencia de Protección

Medioambiental de Estados Unidos (Environmental Protection Agency EPA por sus siglas en ingles) <sup>[18]</sup>, entre otros organismos, han designado comités especiales con este fin. Por otro lado, la ingeniería genética también ha generado especies vegetales resistentes a ciertas plagas, de forma que estos vegetales sean capaces de sintetizar sustancias capaces de combatirlas.

## **1.1 CLASIFICACIÓN DE LOS PLAGUICIDAS**

Los plaguicidas se pueden clasificar en función de diferentes criterios como:

- Función
- Toxicidad
- Grupo estructural

### **1.1.1 Clasificación por función**

Una clasificación bastante extendida en su uso diario se caracteriza por denominar a los plaguicidas según la plaga que pretenden eliminar o controlar. Siguiendo este criterio, la EPA, entre otros clasifica a los plaguicidas como se describe en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación de los plaguicidas según el organismo a controlar <sup>[18]</sup>.

<b>Tipo de plaga</b>	<b>Organismo objeto</b>
Acaricida	Ácaros
Antibióticos	Microorganismos
Alguicidas	Algas
Avicidas	Pájaros
Bactericidas	Bacterias
Defoliantes	Hojas de plantas
Desinfectantes	Microorganismos
Fumigantes	Plagas en edificios, suelos, etc.
Fungicidas	Hongos
Herbicidas	Plantas
Insecticidas	Insectos
Larvicidas	Larvas de insectos
Molusquicidas	Caracoles, babosas
Nematocidas	Nematodos
Ovicidas	Huevos de insectos
Pesticidas	Peces
Repelentes	Insectos, pájaros
Raticidas	Roedores

### **1.1.2 Según su toxicidad**

La Organización Mundial de la Salud (OMS), por su parte ha recomendado, sujeta a actualizaciones periódicas, clasificar a los plaguicidas en función de su toxicidad <sup>[19]</sup>, entendiendo ésta como su capacidad de producir daño agudo a la salud cuando se da una o múltiples exposiciones en un tiempo relativamente corto; atendiendo a dos posibles vías de contacto (oral y tópica) y a la formulación del producto (sólido o líquido), tal como muestra la Tabla 2.

Un indicador de la toxicidad de un compuesto puede ser la dosis letal media o DL<sub>50</sub>, que es la cantidad susceptible para provocar la muerte de un 50% de los animales de experimentación (generalmente ratas). Desde el punto de vista de

los residuos de estos compuestos, interesa mucho más su toxicidad a corto y mediano plazo (toxicidad subcrónica) y sobre todo a largo plazo (toxicidad crónica, por ejemplo el desarrollo de un cáncer) que se averigua también con otros ensayos en diferentes animales.

**Tabla 2.** Clasificación de los plaguicidas recomendada por la OMS <sup>[19]</sup>

CLASIFICACIÓN	DL <sub>50</sub> en ratas (mg/kg de peso corporal)			
	Vía oral		Vía tópica	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
<b>Ia</b> Extremadamente peligroso	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
<b>I b</b> Altamente peligroso	5 - 50	20 - 200	10 – 100	40 – 400
<b>II</b> Moderadamente peligroso	50- 500	200 - 2000	100 – 1000	400 – 4000
<b>III</b> Ligeramente peligroso	≤ 500	≤ 2000	≤ 1000	≤ 4000

### 1.1.3 Según su naturaleza química

Los Plaguicidas pueden tener diferente origen. Los hay de origen natural o totalmente sintéticos (**Tabla 3**). <sup>[16]</sup>

**Tabla 3.** Clasificación de los plaguicidas según su grupo químico <sup>[16]</sup>.

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Compuestos inorgánicos</li> </ul>	<p><b>Estos compuestos que carecen de átomos de carbono, como los derivados de cobre, azufre, zinc y aluminio.</b></p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Compuestos orgánicos</li> </ul>	<p>Son aquellos que contienen átomos de carbono en su estructura química. La mayoría son de origen sintético, fabricados a partir de compuestos químicos básicos; algunos son extraídos de plantas, por lo que se conocen como botánicos. Entre los más utilizados encontramos a los Organofosforados, Organoclorados, Carbamatos, Tirazinas y Piretrinas o Piretroles entre otros.</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plaguicidas biológicos</li> </ul>	<p>Se llaman así a los virus, microorganismos o derivados de su metabolismo, que pueden controlar a una plaga en particular.</p>

## **1.2 USOS DE LOS PLAGUICIDAS**

El empleo de plaguicidas es muy versátil, lo que explica en parte su propagación. En función del consumo, la agricultura es la actividad económica que más emplea este tipo de compuestos utilizando el 85 % de la producción mundial. La finalidad es controlar químicamente las plagas que merman las cosechas de alimentos y otros vegetales <sup>[16]</sup>. A continuación se describe cada uno de los usos de plaguicidas en nuestro país.

### **1.2.1 Uso agrícola y forestal**

Uso en diversas extensiones, en sistemas de producción agrícola y en productos y subproductos de origen vegetal. El alto rendimiento y obtención de productos inocuos se debe al uso de plaguicidas en la agricultura. En la actividad forestal, los plaguicidas tienen la misión de eliminar las plagas que deterioran especies de árboles que son empleados para la obtención de madera o pulpa <sup>[16]</sup>.

### **1.2.2 Uso pecuario**

Uso en animales o instalaciones de producción intensiva o extensiva cuyo producto será destinado al consumo humano o a usos industriales. Incluye el uso en animales domésticos <sup>[16]</sup>.

### **1.2.3 Uso en la salud pública**

Relacionado con la salud pública, los plaguicidas se utilizan en actividades sanitarias, como el control de insectos vectores implicados en la transmisión de enfermedades como la malaria, enfermedad de Chagas o el dengue. También se utilizan para el control de roedores y tratamiento de agua para beber. Aproximadamente 10 % de los plaguicidas utilizados a nivel mundial se dedica a este fin <sup>[16]</sup>.

### 1.3 CONTAMINACIÓN POR PLAGUICIDAS

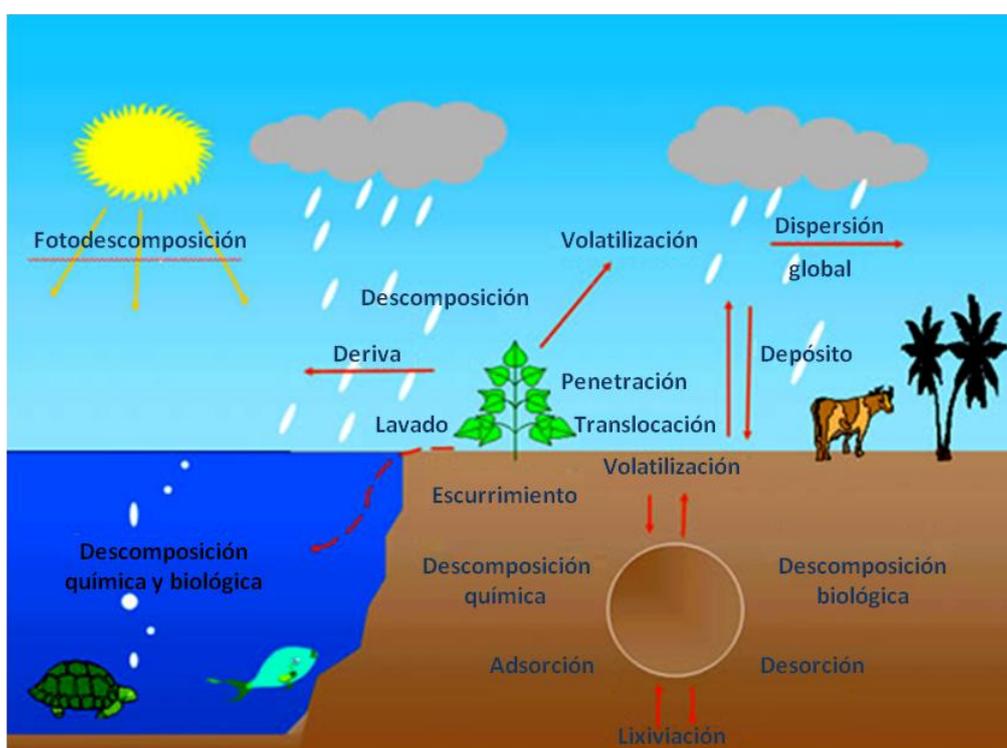
Generalmente, los plaguicidas son aplicados en estado líquido en forma de espray sobre el cultivo y/o suelo, aunque algunas veces se incorporan directamente como sólidos (polvo o gránulos) o a través del tratamiento de semillas. En la industria química, la formulación de estos productos suele tener entre un 75 y un 99% de pureza. Hay que tener en cuenta que no todo el pesticida que se aplica alcanza su objetivo, pues una parte va a parar al suelo, otra se evapora en el momento de la aplicación, etc.; es decir, sólo una parte de la depositada es absorbida. Este porcentaje depende de la naturaleza del plaguicida, de la formulación del producto (concentración, dosis y presencia de coadyudantes que aumenten la retención por la planta), de las características de la aplicación (pulverización, espolvoreo, etc.), condiciones climáticas, morfología y naturaleza de la superficie vegetal <sup>[17]</sup>.

Una vez que se encuentra el plaguicida sobre el vegetal, a lo largo del tiempo, los residuos van disminuyendo progresivamente por acción de diversas causas, como el crecimiento del órgano vegetal tratado, la eliminación por agentes mecánicos como el viento y la lluvia o por causas físicas como la volatilización y/o solubilización y la degradación química, entre otras. Dicha disminución depende, por un lado, de la naturaleza de la especie vegetal así como de la velocidad del desarrollo de la misma y, por otro, de las características del plaguicida y de la formulación aplicada, así como de todo un conjunto de factores climáticos <sup>[20]</sup>.

Se puede afirmar que en la actualidad es frecuente identificar residuos de plaguicidas en los alimentos y en muchos casos se detectan concentraciones de estos por encima de los límites de tolerancia recomendados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO/OMS por sus siglas en Inglés). <sup>[21]</sup>

La contaminación del ambiente por plaguicidas se produce por aplicaciones directas en los cultivos agrícolas, derrames accidentales, lavado inadecuado de tanques o contenedores, filtraciones en los depósitos de almacenamiento y

residuos descargados o depositados en el suelo. Una vez en el suelo, los plaguicidas pueden pasar a los mantos freáticos superficiales y subterráneos por lixiviación, dependiendo de sus características químicas tales como solubilidad en agua, capacidad de absorción sobre el suelo, capacidad de ionización, del tipo de suelo (contenido en arcillas, en materia orgánica, porosidad, etc.). De forma genérica, la ausencia de luz, entre otros, hace que la degradación de los plaguicidas en aguas subterráneas sea lenta. Por otro lado, existe una fracción del producto de aplicación que se volatiliza y pasa a la atmósfera, de forma que son atrapados por el viento y, a su vez, pueden volver a la superficie terrestre con las lluvias o por deposición sólida [20].



**Figura 1.** Posibles mecanismos de transporte y transformación de plaguicidas en el ambiente.

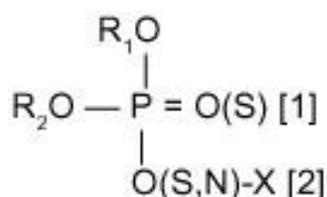
Para evaluar la distribución ambiental de un plaguicida se utilizan parámetros como la constante de Henry, solubilidad en agua, coeficiente de adsorción en suelos, su coeficiente de partición octanol/agua, entre los más utilizados. El valor numérico de estos parámetros determina el grado de afinidad del plaguicida por los sistemas bióticos (animales y plantas) y por los abióticos (suelo, aire y agua).

## 1.4 Plaguicidas organofosforados

Bajo esta denominación se incluyen a más de 200 sustancias químicas que se emplean principalmente como insecticidas y acaricidas, en su mayor parte actúan contra los insectos y los ácaros por contacto y por ingestión; otros son sistémicos y algunos tienen acción fumigante. La mayoría de ellos son tóxicos a los peces, abejas y a la vida silvestre. Algunos de ellos se utilizan como herbicidas, fungicidas, plastificantes, combustibles y como armas químicas (Agentes nerviosos como Sarín, Tabun, Soman y Ziclone-B).<sup>[16, 22]</sup>

Químicamente los plaguicidas organofosforados son ésteres derivados del ácido fosfórico, fosforotioico o fosfonotioico, que a veces tienen grupos amidas o tioles en donde uno o más de los oxígenos del ácido pueden encontrarse sustituidos por azufre y sus radicales oxhidrilos, por diferentes radicales orgánicos, encontrándose diversas combinaciones. Los sustituyentes de este ácido pueden ser grupos alcoxi, o alquil-tio de cadena corta o bien grupos amida o átomos de azufre.<sup>[22, 23]</sup>

La fórmula estructural general de estos compuestos, que se caracterizan por la presencia en general de tres funciones éster, es la siguiente (Figura 2):



**Figura 2.** Estructura General de los Plaguicidas Órganofosforados.<sup>[24]</sup>

En estos compuestos,  $R_1$  y  $R_2$  son radicales alquilo, generalmente metilo o etilo, el grupo X es característico de cada especie química, siendo frecuentemente un radical arilo, y suele contribuir de forma importante a sus propiedades físicas, químicas y biológicas.

Los plaguicidas organofosforados se pueden dividir en 14 grupos, los más importantes son: fosfatos, con un Oxígeno en las posiciones [1] y [2]; **O-fosfortioatos** o **tionatos**, con un Azufre en [1] y un Oxígeno en [2], **S-fosfortioatos** o **tiolatos**, con un Azufre en [2] y un Oxígeno en [1]; **fosforoditioatos** o **tiolotionatos**, con un Azufre en [1] y en [2]; **fosfonatos**, con R<sub>1</sub> (en lugar de R<sub>1</sub>O), Oxígeno o bien Azufre en [1] y Oxígeno en [2], y **fosforoamidatos**, con un Oxígeno en [1] y un Nitrógeno en [2].

Se trata de compuestos poco persistentes en el ambiente, en general, marcadamente apolares, lo que significa que desde el punto de vista químico la mayoría son escasamente solubles en agua, aunque con grandes diferencias de un compuesto a otro. Con excepción del diclorvos, la mayoría de los plaguicidas organofosforados tiene baja volatilidad. Desde el punto de vista biológico son liposolubles por lo que tienden a disolverse en grasas. Por tal motivo, la piel, donde se encuentra una importante capa de tejido con elevado contenido en lípidos, puede constituirse en una importante vía de entrada.<sup>[16, 24]</sup>

#### **1.4.1 Toxicidad**

Los plaguicidas organofosforados tienen diferentes características comparados con los pesticidas organoclorados, entre ellas, su baja persistencia en el ambiente, su no acumulación en el organismo y su bajo potencial de carcinogenicidad; sin embargo, su toxicidad aguda es mayor. Su estructura química puede ser muy variada y de ella dependerá su toxicidad. Algunos productos de este tipo son extremadamente tóxicos y se han empleado con fines bélicos como gases neurotóxicos.

Estos compuestos se absorben bien por inhalación, ingestión o vía cutánea. Su mecanismo de acción es por inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa; el fenómeno ocurre en las sinapsis nerviosas, en donde el neurotransmisor acetilcolina actúa sobre la membrana postsináptica a la que despolariza. De esta manera, excita a las células efectoras: glándula, fibras musculares lisas, fibras musculares estriadas y a otras neuronas. Una vez conseguido su objetivo, la función de este neurotransmisor debe terminar, lo que ocurre por

acción de la acetilcolinesterasa, enzima que rápidamente hidroliza a la acetilcolina, con lo que esta deja de actuar y las células efectoras entran en reposo, para volverse a reactivar cuando el organismo lo demande.

El mecanismo de acción consiste en la liberación de fósforo de la molécula del plaguicida, el cual se asocia a la acetilcolinesterasa inhibiendo la transmisión nerviosa, lo que causa un bloqueo despolarizante en la sinapsis muscarínicas y nicotínicas en las uniones mioneurales del esqueleto y los ganglios autónomos (efectos nicotínicos) así como en el sistema nervioso central, en los insectos o humanos, provocando la muerte ante una exposición prolongada.

Todos los plaguicidas organofosforados se degradan por hidrólisis en el hígado y en otros tejidos, generalmente durante las horas siguientes en que ocurre la absorción. Los productos de la degradación o metabolitos son de baja toxicidad y se excretan en la orina o en las heces. Sin embargo, algunos se convierten en productos intermedios más tóxicos antes de ser metabolizados<sup>[16, 22]</sup>.

#### 1.4.2 Compuestos más utilizados

- **Clorpirifos:** Insecticida-acaricida activo por ingestión, contacto e inhalación. Su toxicidad es moderada (DL<sub>50</sub> oral para la rata de 96-270 mg/kg). No es muy soluble en agua, de manera que se mezcla con líquidos aceitosos antes de aplicarse a cosechas o animales. Posee un amplio campo de actividad. Se utiliza no solo en la agricultura y en la ganadería para controlar garrapatas, sino también en los hogares, contra las cucarachas, pulgas y termitas.<sup>[22, 24, 25]</sup>
- **Diazinon:** Insecticida-acaricida no sistémico con acción por ingestión, contacto e inhalación. Su toxicidad es baja (DL<sub>50</sub> oral para rata de 300-400 mg/kg). La mayor parte del diazinón se usa en forma líquida, aunque no se disuelve fácilmente en agua. Se usa en la agricultura, en los hogares y en jardines, controla moscas, pulgas, cucarachas y hormigas.<sup>[22, 25]</sup>

- **Dimetoato:** Insecticida-acaricida sistémico con actividad por ingestión y contacto. Su toxicidad es moderada (DL<sub>50</sub> oral para la rata de 255-310 mg/kg). Se utiliza con frecuencia en las zonas olivareras de nuestro país. [22, 25]
- **Fentión:** Insecticida penetrante, con acción por ingestión y contacto. Su toxicidad es moderada (DL<sub>50</sub> oral para la rata de 250 mg/kg). Es muy tóxico para abejas y aves. [22, 24]
- **Malatión:** Su descubrimiento en 1950 fue un hito en la historia de los Pesticidas organofosforados (POF), puesto que fue el primer POF que mostró un amplio espectro de acción y una baja toxicidad para los mamíferos. Es un insecticida-acaricida de tipo sistémico, con acción por ingestión y contacto. En los organismos vivos se metaboliza a malaxón, su forma más tóxica. Su toxicidad es baja (DL<sub>50</sub> oral para la rata de 1.000-2.800 mg/kg). El malatión es bastante liposoluble por lo que se absorbe con rapidez en el organismo humano. Se usa en la agricultura para eliminar mosquitos y la mosca de la fruta principalmente, en jardines y el hogar para tratar piojos y pulgas [22, 24, 25].
- **Methamidophos:** Insecticida-acaricida con actividad por vía sistémica, ingestión y contacto. Su toxicidad es alta (DL<sub>50</sub> oral para la rata de 20 mg/kg), por lo que está prohibido su uso en invernaderos y en recintos cerrados. [22, 24, 25]
- **Monocrotofos:** Insecticida-acaricida con actividad por vía sistémica y por contacto. Su toxicidad es alta (DL<sub>50</sub> oral para la rata de 8-23 mg/kg). [22]

A pesar de que los plaguicidas actuales no son altamente persistentes en el medio, el principal problema que se plantea es que muchos de ellos son empleados en concentraciones muy por encima de las recomendadas o bien, a pesar de estar prohibido el uso de ciertos grupos de ellos, se utilizan ilegalmente o erróneamente en muchos lugares (por ejemplo, pesticidas de aplicación floral no permitidos en frutas o vegetales). Además, hay que tener en cuenta que los permitidos en ciertos países, pueden no estarlo en otros. [26]

El ser humano puede ingerir residuos de plaguicidas al consumir productos vegetales que hayan sido tratados con los mismos. Cuando el plaguicida presenta cierta resistencia y, además, es soluble en las grasas (tejidos adiposos), dado que las cadenas alimentarias comienzan en los vegetales y terminan en los animales superiores, en esos últimos casos pueden encontrarse cantidades mayores de plaguicidas persistentes debido a su sucesiva acumulación en la cadena alimentaria. Actualmente, con la prohibición del uso de plaguicidas clorados de alta persistencia, este problema se ha reducido considerablemente. Los productos actuales, aunque tienen una velocidad de degradación más rápida, pueden causar cierta contaminación, aunque el problema sea mucho menor que antes <sup>[27]</sup>.

En lo que a la exposición del ser humano a residuos de plaguicidas se refiere, el grado de exposición depende de dos factores claramente diferenciados: por un lado, el de los tratamientos efectuados por los agricultores y, por otro, de la composición de la dieta alimentaria media en la zona geográfica considerada. Conocer este grado de exposición es importante, pero ello exige realizar estudios rigurosos a nivel estatal, regional y local, considerando tanto alimentos vegetales como animales <sup>[27]</sup>.

## **1.5 LEGISLACIÓN GLOBAL EN MATERIA DE PLAGUICIDAS**

El incremento del volumen global de productos químicos comercializados ha provocado preocupaciones acerca de sus efectos a largo plazo en la salud humana y en el ambiente. En las últimas décadas, varios acuerdos internacionales se han centrado en controlar los riesgos asociados a las sustancias químicas peligrosas. <sup>[28]</sup>

Los acuerdos globales para la reducción y eliminación eventual de estas sustancias mediante la restricción de su producción y comercialización es un proceso a largo plazo.

Desde la primera Conferencia Internacional sobre el ambiente [Estocolmo 1972] se ha planteado la necesidad de controlar los riesgos de las sustancias

químicas peligrosas, centrando la atención internacional en temas relacionados con el ambiente, especialmente lo concerniente a la degradación ambiental y la contaminación transfronteriza, señalando el hecho de que la contaminación no reconoce los límites políticos o geográficos y afecta a los países, regiones y pueblos más allá de su punto de origen. Durante las décadas que siguieron a la Conferencia de Estocolmo, este concepto se amplió para abarcar temas ambientales que requieren una acción conjunta de todos los países y regiones del mundo para enfrentarse a ellos de un modo efectivo. En la Cumbre para la Tierra de 1992 se reconoció internacionalmente el hecho de que la protección del ambiente y la administración de los recursos naturales deben integrarse en las cuestiones socioeconómicas de pobreza y subdesarrollo.<sup>[30]</sup>

En 1994, 103 países adoptaron el Programa Ambiental de las Naciones Unidas (UNEP por sus siglas en Inglés) con un acuerdo para la protección del ambiente marino (Washington Declaration on Protection of the Marine Environment and Land Based Activities Agreement, 1994) que contemplan la reducción de 12 sustancias conocidas como Compuestos Orgánicos Persistentes (COP's). Se reconoció que los COP's son transportados de manera global por el aire y el mar, dando por resultado un aumento en sus concentraciones lejos del sitio original de uso.<sup>[28]</sup>

Así mismo, el Convenio sobre Procedimientos de Consentimiento con Fundamento Previo o (CFP), (Prior Informed Consent Agreement o PIC)<sup>[30]</sup> para ciertos productos químicos peligrosos y plaguicidas en comercio internacional, fue acordado en Rotterdam, Países Bajos, en septiembre de 1998. Este convenio también conocido como Convenio de Rotterdam entró en vigor el 24 de febrero de 2004 y tiene los siguientes objetivos:

- Promover la responsabilidad compartida y los esfuerzos conjuntos de las Partes en la esfera del comercio internacional de ciertos productos químicos peligrosos a fin de proteger la salud humana y el ambiente frente a posibles daños.

- Contribuir a su empleo ambientalmente racional, facilitando el intercambio de información acerca de sus características, estableciendo un proceso nacional de adopción de decisiones sobre su importación y exportación, y difundiendo esas decisiones a las partes.

El CFP regula las importaciones y exportaciones de determinados productos químicos y plaguicidas peligrosos; cualquier producto químico especificado en éste sólo puede ser exportado con el consentimiento previo del importador. El Convenio del CFP crea un procedimiento para conocer y dar a conocer las decisiones de los países importadores, ampliando así el principio CFP en el comercio internacional de productos químicos. Así mismo, establece disposiciones por las que se exige información detallada sobre los productos que permita decidir la importación de los mismos, conociendo las propiedades y efectos de los productos químicos industriales que han sido notificados para su inclusión en el procedimiento de CFP. El Convenio se aplica a 39 productos químicos (incluyendo 24 plaguicidas, 4 formulaciones plaguicidas extremadamente peligrosas) y 11 productos químicos industriales (Tabla 4).

**Tabla 4.** Productos químicos sujetos al procedimiento de Consentimiento Fundamentado Previo, <sup>[30]</sup>

Ácido 2,4,5-Triclorofenoxiacético	HCH
Aldrín	Heptacloro
Captafol	Hexaclorobenceno
Clordano	Lindano
Clordimeformo	Pentacloro fenol
Clorobencilato	Menocrotophos
DDT	Metamidofos
Dieldrín	Fosfamidón
Dinoseb	Metil-paratión
Dibromoacetano	Paratión
Fluoroacetamida	

El 6 de febrero del 2006, en Dubái, la Conferencia Internacional sobre la gestión de los productos químicos (ICCM por sus siglas en inglés) aprobó el Enfoque Estratégico para la Gestión de los Productos Químicos <sup>[28]</sup> que constituye un marco de política para la acción internacional ante los riesgos internacionales destinadas a lograr la meta del Plan de aplicación de las Decisiones de Johannesburgo que para 2020 los productos químicos se produzcan y utilicen de manera que se reduzca al mínimo los efectos. El éxito de su aplicación probablemente traiga consigo un mayor reconocimiento de la seguridad química como cuestión del desarrollo sostenible que concierne a todos los sectores y a la aceleración de la creación de capacidad para ayudar a los países en desarrollo y a los países con economías en transición a lograr la gestión racional de los productos químicos.

### 1.5.1 La situación en México

En base al Procedimiento de Consentimiento con Fundamento Previo (PIC) en México se tiene la Propuesta Ejecutiva Nacional del Registro de Emisiones y Transferencia de Contaminantes (RETC), se elaboro una propuesta que incluye plaguicidas cuyo uso está prohibido en México (aldrín, endrin) y aquellos prohibidos en su comercialización y uso (más no su producción) como el caso de Toxafeno<sup>[31]</sup>. El RETC es limitado a la producción industrial de plaguicidas en México y no incluye un registro del uso de plaguicidas. En la tabla 5 se muestran los pesticidas incluidos en el RETC.

**Tabla 5.** Plaguicidas incluidos en la propuesta del RETC en México <sup>[30, 31]</sup>

Lindano	Captan	Warfarina
Endosulfán	DDT	Trifuralin
Silbes	Diazinon	Clorpirifos
Ácido 2,4,-diclorofenoxiacético	Endrín *	Aldrin *
Disulfuro de tetrametiltiuram	Heptacloro *	Toxafeno *

\* Prohibidos en México

En el caso de México, el plan de acción incluye los siguientes objetivos <sup>[32]</sup>:

- La eliminación de los usos ilegales del DDT
- Su reducción gradual para el control del paludismo en un 80% para el año 2001
- Su eliminación total en los próximos 10 años, si persiste la tendencia a la baja del paludismo

El 15 de octubre de 1987 se publicó en el diario Oficial de la federación el decreto que establece las bases de coordinación entre la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (actualmente de Economía), la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (actualmente de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación), la Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología (actualmente de Medio Ambiente y Recursos Naturales) y la Secretaría de Salud, para el ejercicio de las atribuciones respecto a plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas, que les confiere, la Ley de Sanidad Vegetal, la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y la Ley General de Salud.

En apego al decreto que crea la comisión Internacional para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST), la Comisión Intersecretarial publicó en los años de 1998 el Catálogo Oficial de Plaguicidas, que contiene los productos registrados y sus usos autorizados, sus características principales, así como las indicaciones para su uso información sobre los riesgos que los mismos implican y sobre el tratamiento en caso de intoxicaciones. El propósito de este catálogo es ayudar al buen uso y manejo de estos productos en las áreas de empleo: agrícola, forestal, pecuario, doméstico, urbano, industrial y en jardinería. Se integra en este catálogo la información de los plaguicidas registrados en México, las características generales de los mismos, así como las aplicaciones para las que se dio la autorización.

*Los únicos plaguicidas cuya importancia comercial y uso están permitidos en México, son los que han sido registrados por la CICOPLAFEST.*

La principal actividad de la CICOPLAFEST, es la atención al usuario en lo relativo a la emisión de registros y autorizaciones de importación de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. El catálogo de plaguicidas es un documento oficial elaborado por la Secretaría que Integran a la CICOPLAFEST. La versión 2004 es una actualización del Catálogo Oficial de Plaguicidas emitido en 1988, e incluye información sobre los usos, sinonimia, mezclas y coadyudantes de las sustancias registradas, hasta junio de 2004. Los pesticidas se encuentran regulados por disposiciones ambientales, sanitarias, fito y zoosanitarias, laborales y de transportes.

Los plaguicidas de la tabla 6 solo pueden ser adquiridos en las comercializadoras mediante la presentación de una recomendación escrita de un Técnico Oficial o Privado que haya sido autorizado por el Gobierno Federal. Su manejo y aplicación se efectuará de acuerdo a la NOM que establece los registros y especificaciones fitosanitarias para el manejo de Plaguicidas Agrícolas Restringidos.

**Tabla 6.** Plaguicidas agrícolas restringidos en México <sup>[16]</sup>

1,3-dicloropropeno	Metoxicloro	Mevinfos
Alaclor	Metamidofos	Cloropicrina
Aldicrab	Metan sodio	Paraquat
Bromuro de metilo	Lindano	Pentaclorofenol
Clordano	Dicofol	Quintozeno
Fosfuro de aluminio	Forato	Clorotalonil
Isotiocianato de metilo		

En la tabla 7 se presentan los pesticidas autorizados en México y ya prohibidos en otros países y considerados de interés prioritario en el Convenio de Estocolmo sobre COP, como es el caso de Clordano, DDT, Lindano, Paracuat, Metil Paratión y Pentaclorofenol.

**Tabla 7.** Plaguicidas prohibidos en otros países y autorizados en México <sup>[32]</sup>

Alaclor	Pentaclorofenol	Oxyfluorfen	Diurón
Aldicarb	Meditación	Metil Paratión	Dicofol
Azinfos Metílico	Metamidofos	Endosulfán	Quintoceno
Captafol	Metoxicloro	Forato	Sulprofos
Carbarilo	Mevinfos	Fosfaamidón	Triazofos
Captan	Monocrofos	Kadetrina	2,4-D
Clordano	Ometoato	Linuron	Vamidotion
DDT		Maneb	

## **1.6 METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS EN MUESTRAS AMBIENTALES**

La elevada toxicidad de los plaguicidas presentes en el ambiente obliga a disponer de métodos analíticos fiables, rápidos, económicos y suficientemente sensibles que permitan el control de los compuestos tóxicos en diversos tipos de muestras, tanto en matrices biológicas (alimentos, tejidos animales, tejidos vegetales), como en ambientales (agua, suelo, aire).

La Química Analítica frente al análisis de residuos de plaguicidas tiene ante sí un reto importante, ya que existe una fuerte demanda social exigiendo el control de todo tipo de contaminantes en el ambiente. Por otro lado, sólo es posible establecer legislaciones restrictivas sobre niveles de contaminantes cuando existan métodos adecuados para su análisis.

El análisis de pesticidas en alimentos está sujeto a la complejidad de la matriz y a las bajas concentraciones a las cuales estos compuestos están presentes. Por lo tanto, la extracción de los residuos constituye el paso más crítico. Este paso consiste en la extracción de los analitos desde su matriz con un disolvente apropiado; opcionalmente se puede realizar la remoción de sustancias que podrían causar interferencias mediante varios pasos de

limpieza y finalmente, la reducción del volumen del disolvente en el extracto antes del análisis instrumental <sup>[33]</sup>.

Los artículos revisados <sup>[4, 34-37]</sup> muestran los diferentes procedimientos de extracción a los que se suelen someter las muestras (principalmente aguas, suelos y frutas), para su posterior análisis y cuantificación, en lo que a contenido en pesticidas se refiere.

Después de la extracción, el análisis se continúa comúnmente con la separación de los analitos. En los que a técnicas de separación se refiere hoy en día la cromatografía de gases (GC) es la técnica más ampliamente empleada para el análisis multiresidual de plaguicidas, siendo, en general, capaz de conseguir los límites de detección más bajos (en el rango de los  $\mu\text{g/L}$  incluso en algunos casos  $\text{ng/L}$ ). Muchos métodos oficiales de análisis están basados en esta técnica en los que se utilizan diferentes detectores, como el de nitrógeno y fósforo (NPD), de captura electrónica (ECD), de ionización de llama (FID) o de espectrometría de masas (MS). Este último caso, dada las ventajas actuales que presenta la detección por MS, ésta es cada vez más utilizada, siendo el impacto electrónico la técnica de ionización más utilizada en casi todos los casos <sup>[34]</sup>.

Sin embargo, el análisis de compuestos de alto peso molecular, altamente polares o térmicamente lábiles presenta grandes dificultades o es prácticamente imposible de realizar mediante GC. Este hecho ha provocado que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) haya ido ganando terreno en el análisis de este tipo de compuestos y más aún, su acoplamiento a un espectrómetro de masas. La técnica HPLC presenta también la ventaja adicional de permitir derivatizaciones pre- y post- columna de los analitos con objeto de mejorar su detección. El reciente desarrollo de columnas de cromatografía líquida que contienen polímeros impresos molecularmente (MIP) ha sido bastante popular en el análisis de pesticidas dada su gran estabilidad, bajo costo y sencillez de preparación <sup>[4]</sup>.

## **1.7 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE ANALITOS ORGÁNICOS**

El proceso analítico se define como “el conjunto de operaciones comprendidas entre la muestra –sin tomar, sin medir, sin tratar- y los resultados expresados según los requerimientos”.

Generalmente la determinación de plaguicidas en muestras ambientales no se puede realizar de forma directa en la muestra, sino que son necesarias una serie de etapas previas que constituyen el proceso analítico:

- Estrategia de muestreo (toma de muestra)
- Almacenamiento y conservación
- Pre-tratamiento de la muestra
  - Extracción y separación del analito de la muestra
  - Limpieza y purificación del extracto
  - Pre-concentración del extracto
- Determinación instrumental

Dentro del mismo, se distinguen tres grandes etapas: las operaciones previas, que preparan a la muestra para la medición analítica en sí, la medición y la transducción de la señal analítica, y la toma y el tratamiento de los datos. En la mayoría de los procesos analíticos actuales, más del 80 % del tiempo de análisis se invierte prácticamente en la toma y pre-tratamiento de la muestra. Pre-tratamiento que, por otro lado, es imprescindible en la actualidad dado que en una determinada muestra existen multitud de compuestos que pueden interferir en la medida analítica, siendo muy pocas las muestras que actualmente pueden ser analizadas directamente.

## **A. Muestreo**

Por lo que respecta a la toma de muestra, hay que tomar en cuenta que en muchas ocasiones la representatividad de la muestra, es decir, su capacidad de reflejar la exposición al plaguicida, dependerá de la toma. Generalmente, existen procedimientos estandarizados de toma de muestra para muestras ambientales, normalmente se suelen utilizar volúmenes de 1L.

En cuanto al transporte de este tipo de muestras, debe ser tal que evite contaminaciones, evaporaciones, derrames, roturas, etc., que son las causas más frecuentes de que se pierdan las muestras, durante su transporte al laboratorio o bien durante su almacenamiento. Por tal motivo, una vez finalizada la toma, el cierre perfecto de los frascos, o recipientes conteniendo las muestras, su colocación en cajas adecuadas provistas de material de relleno para evitar choques fortuitos y las consiguientes roturas.

## **B. Almacenamiento**

El tiempo máximo de almacenamiento de las muestras antes de un análisis depende de los parámetros o compuestos a determinar y para la determinación de plaguicidas se recomienda que sea lo antes posible. En general, el almacenamiento de la muestra debe hacerse mediante refrigeración (aproximadamente 4 °C), lejos de la luz solar en todo momento; en algunos casos concretos puede ser necesaria la adición de algunos conservadores químicos o biocidas (para evitar la degradación de algunos analitos por parte de los microorganismos presentes. La colocación en las condiciones adecuadas de conservación a partir del momento de la llegada al laboratorio, son cuestiones que no pueden ser pasadas por alto si se desea obtener una buena fiabilidad en los resultados.

## C. Extracción

En la etapa de preparación de la muestra se incluye generalmente un paso de extracción de los plaguicidas o metabolitos y otro alternativo de purificación, que debe ser lo suficientemente efectiva para separar a los analitos de los interferentes que están formando parte de la matriz correspondiente a una muestra extremadamente compleja. Muchos factores deben ser considerados para la elección de la técnica de extracción a desarrollar, principalmente los relacionados con el tipo de matriz objeto de estudio.

El reto en la extracción de pesticidas es maximizar la recuperación de los analitos y minimizar las interferencias mediante el uso de una extracción apropiada. El proceso de extracción comienza con separar los analitos de la matriz y presentar el material en una forma que pueda analizarse más fácilmente. La extracción selectiva de analitos se basa en sus diferentes características y propiedades químicas y físicas, como: peso molecular, carga, solubilidad, polaridad, volatilidad.

Típicamente, la mayoría de los procedimientos revisados en la bibliografía requieren la extracción de los plaguicidas mediante disolventes orgánicos, solos o en mezcla, usando un homogeneizador, mezclador o sonicador; o mediante extracción en fase sólida (SPE por sus siglas en inglés), dependiendo la naturaleza de la muestra. La SPE es una técnica de preparación y tratamiento de muestras, basada en la retención selectiva de los analitos y su posterior elución. En ella, los solutos son extraídos de una fase líquida o gaseosa mediante una fase estacionaria sólida apropiada. Es la técnica más empleada en el análisis multi-residuos de pesticidas en vegetales, además esta técnica es relativamente sencilla, rápida y se recupera un porcentaje alto de los residuos de pesticidas presentes en los vegetales <sup>[38, 39]</sup>. Otras técnicas más novedosas son la microextracción en fase sólida (SPME), extracción asistida por microondas (MAE) y la extracción en punto de nube o cloud point (CPE) se están aplicando cada vez más en la determinación de plaguicidas en diferentes matrices, debido a su simplicidad y a la poca manipulación de la muestra <sup>[40, 41]</sup>.

## **D. Purificación de la muestra (clean-up)**

La determinación de contaminantes orgánicos, presentes en niveles de trazas en muestras medioambientales o alimentos, requiere de un proceso de purificación o limpieza del extracto con el que se consiga separar los analitos a determinar de las especies interferentes y que además se obtenga una recuperación cuantitativa de todos ellos. Las especies interferentes presentes en este tipo de muestras son generalmente compuestos de elevado peso molecular, como lípidos, polímeros o pigmentos, que imposibilitan la posterior determinación cromatográfica (tanto por GC como por HPLC), además de ocasionar el deterioro de la columna cromatográfica. Las metodologías más frecuentemente empleadas para la limpieza de extractos cromatográficos son: extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida y cromatografía de permeación en gel.<sup>[39, 42]</sup>

La extracción en fase sólida, es la que nos interesa describir, ya que fue la empleada en el presente trabajo. Este método de extracción también es ampliamente utilizado como proceso de limpieza de extractos. Las fases más empleadas para realizar SPE en fase normal son generalmente adsorbentes inorgánicos polares, como gel de sílice, alúmina o florisil (gel de sílice de magnesio). Estos soportes retienen muy fuertemente los compuestos orgánicos hidrofílicos y en menor medida los compuestos hidrofóbicos. El proceso de elución se realiza con un disolvente hidrofóbico, como por ejemplo hexano, al que se van añadiendo pequeñas cantidades de modificador, que suele ser un disolvente más hidrofílico, produciéndose una separación paulatina de los compuestos según su hidrofobicidad. También se pueden emplear soporte hidrofóbicos como carbón garantizando o fases orgánicas unidas a sílice como la C18, donde se retienen los compuestos muy lipofílicos eluyéndose el resto.

El empleo de la SPE como método para realizar la limpieza de los extractos cromatográficos está ampliamente extendido para la determinación de multitud de analitos en matrices de distinta índole.<sup>[40, 41]</sup>

## E. Determinación instrumental

La elección de técnicas analíticas para determinación instrumental depende de una variedad de factores incluyendo costo, disponibilidad, selectividad, sensibilidad, propiedades de los analitos y capacidad de análisis. En el caso de los plaguicidas, esta determinación se lleva a cabo mediante técnicas cromatográficas, *cromatografía de gases* (CG) o *cromatografía de alta resolución* (HPLC), acoplados a detectores que permitan la obtención de una sensibilidad y selectividad adecuadas. Aunque una gran variedad de detectores, tales como *espectrometría UV-Vis* (UV), *fluorescencia* (FD), *arreglo de diodos* (DAD), *captura de electrones* (ECD) o el de *nitrógeno fosforo* (NPD), han sido tradicionalmente utilizados, actualmente tiene mucha más importancia la *espectrometría de masa* (MS) como sistema de detección en el análisis de plaguicidas mediante GC o LC.

La elección entre la GC y HPLC depende de las características fisicoquímicas de los pesticidas. La GC se emplea principalmente para pesticidas que se vaporizan fácilmente sin degradarse, con puntos de ebullición por debajo de los 250°C y polaridades bajas o intermedias en el análisis. En cambio, HPLC se utiliza para pesticidas muy polares que no son fácilmente vaporizables, con puntos de ebullición por encima de los 200°C y que son lábiles térmicamente [43, 44].

## 1.8 MANZANA (MALUS DOMESTICA)

La manzana es una fruta pomácea de tipo climatérica, comestible obtenida de la semilla del manzano doméstico (*Malus domestica*), otros manzanos (especies del género *Malus*) o híbridos de aquel <sup>[45]</sup>.

### 1.8.2 Origen

El origen de los manzanos, como el de otras plantas cultivadas desde tiempos remotos, posiblemente mucho antes de la era cristiana, es poco claro. Actualmente se acepta que en la formación de los manzanos cultivados han intervenido especies como *Malus sylvestris*, *Malus orientalis Uglitzk* y *Malus sieversii*. Algunos autores suponen que estos frutales se originaron en el Cáucaso y Turkeistán, por la gran variación en la formas y en los sabores de las manzanas que allí se encuentran. El *M. sieversii* es una especie todavía presente en las montañas de Asia central <sup>[45, 46]</sup>.

El manzano fue introducido en Europa por los romanos y en la actualidad existen unas mil variedades, como resultado de innumerables hibridaciones entre formas silvestres. El manzano se cultiva en regiones templadas y en las partes más altas y frías de los trópicos <sup>[46]</sup>. Entre los países y regiones productoras de manzanas más importantes se pueden mencionar los siguientes (Tabla 8):

**TABLA 8. PRINCIPALES PRODUCTORES DE MANZANA.**Según *Foods and Agriculture Organization of the United Nations*. 2011<sup>[13]</sup>

<b>PRODUCTOR</b>	<b>TONELADAS</b>	<b>PRODUCTOR</b>	<b>TONELADAS</b>
<b>China</b>	35,987,221	<b>Chile</b>	1,169,090
<b>USA</b>	4,272,840	<b>Argentina</b>	1,115,950
<b>India</b>	2,891,000	<b>Ucrania</b>	954,100
<b>Turquía</b>	2,680,080	<b>Alemania</b>	898,448
<b>Polonia</b>	2,493,080	<b>Corea</b>	806,718
<b>Italia</b>	2,411,200	<b>África del Sur</b>	781,124
<b>Francia</b>	1,858,880	<b>Uzbekistán</b>	779,000
<b>Irán</b>	1,651,840	<b>España</b>	670,566
<b>Brasil</b>	1,339,000	<b>Japón</b>	655,300
<b>Rusia</b>	1,200,000	<b>México</b>	630,533

### 1.8.3 Morfología

La manzana pertenece a la familia de las *Rosáceas*, al igual que la mayor parte de las frutas de clima templado, cultivadas por su fruto, que es apreciado como alimento. Esta fruta se incluye dentro del grupo de los frutales de pepita, junto con la pera y el membrillo. Sin embargo, la clasificación botánica de la manzana es un tanto confusa <sup>[2]</sup>. Este fruto es un árbol que puede alcanzar hasta 12 m de altura y vivir hasta 80 años, inerte, caducifolio, de copa redondeada abierta y numerosas ramas que se desarrollan casi horizontalmente <sup>[2]</sup>. El tronco tiene corteza agrietada que se desprende en placas. Las hojas, estipuladas, son ovaladas u obtusas, de base redondeada, generalmente de bordes aserradas pero ocasionalmente sub-enteras, de fuerte color verde y con pubescencia en el envés. Al estrujarlas despiden un agradable aroma <sup>[46]</sup>.

La inflorescencia también llamada cima puede estar compuesta de 4 a 8 flores hermafroditas, siendo la central la primera en formarse en posición terminal, resultando la más desarrollada y competitiva. A ésta se le llama comúnmente "flor reina" y generalmente produce los frutos de mayor tamaño y calidad. Dichas flores son hermafroditas, con un cáliz de cinco sépalos, una corola de 5 pétalos blancos, redondeados, frecuentemente veteados de rojo o rosa, con uña milimétrica y 20 estambres <sup>[45, 47]</sup>. El manzano florece en primavera y su fruto, la manzana, llamado pomo, es globoso, de color verde, amarillo o rojizo que suele madurar hacia el otoño. El manzano silvestre se diferencia del doméstico por un color verde amarillento en su piel y sabor agrio <sup>[45]</sup>.

#### **1.8.4 Importancia nutricional**

La manzana ha sido considerada por muchas civilizaciones un símbolo de vida e inmortalidad. La creencia popular dice que una manzana al día mantiene lejos al doctor, y hoy tenemos suficientes evidencias científicas para afirmar que dicha creencia es verdadera. Las manzanas poseen altas cualidades nutricionales que las hacen un alimento perfecto debido a que no contienen grasas, colesterol, ni sodio, además de ser un alimento con escasa cantidad de calorías <sup>[47]</sup>; 100 g de manzana aportan solamente 50 kcal y la mayor parte de su peso es agua. El segundo constituyente en importancia son los hidratos de carbono ya que contiene azúcares simples que le confieren un sabor dulce y algunos ácidos orgánicos que le otorgan un ligero sabor ácido. La manzana es una fuente importante de ciertos minerales (potasio, fósforo y magnesio) y es rica en pectinas, fibra y vitamina C (Tabla 9).

Popularmente se le asignan propiedades antiinflamatorias del aparato digestivo, gracias a la pectina que es a la vez laxante suave y astringente en caso de diarreas o colitis; presenta además efectos diuréticos y depurativos así como anticatarrales e hipotensores.

**TABLA 9. VALORES NUTRICIONALES DE LA MANZANA.**

Según *Nutritive Value of Foods*. United States Department of Agriculture. 2002<sup>[48]</sup>

<b>Manzana</b>	
Valor nutricional por cada 100 g c/ piel	
Carbohidratos	13.81 g
Azúcares	10.39 g
Grasas	0.17 g
Proteínas	0.26 g
Agua	85.56 g
Vitamina A	3 µg (0%)
β-caroteno	27 µg (0%)
Tiamina (Vit. B1)	0.017 mg (1%)
Riboflavina (Vit. B2)	0.026 mg (2%)
Niacina (Vit. B3)	0.091 mg (1%)
Ácido pantoténico (B5)	0.061 mg (1%)
Vitamina B6	0.041 mg (3%)
Ácido fólico (Vit. B9)	3 µg (1%)
Vitamina C	4.6 mg (8%)
Vitamina E	0.18 mg (1%)
Vitamina K	2.2 µg (2%)
Calcio	6 mg (1%)
Hierro	0.12 mg (1%)
Magnesio	5 mg (1%)
Manganeso	0.035 mg (2%)
Fósforo	11 mg (2%)
Potasio	107 mg (2%)
Zinc	0.04 mg (0%)

### 1.8.5 Cultivo en México

La manzana, gracias a su enorme adaptabilidad, logró dispersarse a diversas regiones de tal forma que hoy es uno de los principales frutos que se producen y consumen a nivel mundial <sup>[45]</sup>. En México, la manzana fue introducida con la colonización en el siglo XVII y actualmente ocupa el sexto lugar en producción

con el 4.2 % del volumen total de los productos frutícolas y un consumo de 6.5 kg. por persona al año <sup>[49]</sup>.

De acuerdo a la forma de consumo de este producto, se pueden distinguir tres grupos: manzanas para mesa, para cocinar, y para la agroindustria (sidra, jugos y deshidratada). En el aspecto de producción comercial, las variedades que mayormente destacan en nuestro país son <sup>[45, 49, 50]</sup>.

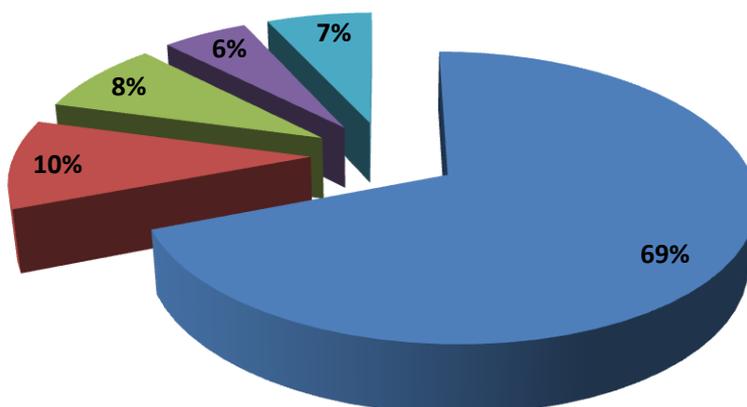
- **Golden Delicious.** Fruto no muy resistente a la manipulación; de cáscara amarillo intenso en plena maduración. Su pulpa es de color blanca cremosa, compacta, succulenta, bastante dulce, ácida y medianamente aromática. Su cosecha se lleva a cabo entre los meses de agosto a octubre <sup>[49, 50]</sup>.
- **Red Delicious.** Su tamaño es variable, con cáscara delgada, lisa y brillante; de color verde estriado de amarillo y rojo. Su pulpa es blanca y verdosa, fina, fundente, azucarada, agridulce, jugosa y perfumada. Su época de cosecha es en los meses de septiembre a noviembre <sup>[49, 50]</sup>.
- **Strarking.** Es una mutación de Red Delicious. Fruto grande, cónico, con cinco lóbulos alrededor del ojo muy marcado. Carne amarilla crujiente, de sabor muy agradable. Epidermis de color rojo vinoso y con estrías más oscuras. Árbol de buen vigor y fertilidad. Buena conservación en frigorífico. Recolección en octubre <sup>[50]</sup>.
- **Rome Beauty.** Fruto grueso de forma esferoidal, su cáscara es bastante gruesa, amarilla verdosa, cerca de 40-60% de la superficie es de un color intenso. La pulpa es blanca o blanca crema, no muy compacta, poco o medianamente succulenta, poco dulce, poco ácida, poco aromática, de mediana a escasa característica gustativa <sup>[49]</sup>.
- **Dorset Golden.** Fruto grueso a muy grueso, de alta resistencia a la manipulación. Su cáscara es gruesa, verdosa y coloreada de rojo, mientras que su pulpa es blanca cremosa, muy compacta y poco succulenta, dulce, medianamente a poco ácida, poco aromática, de mediana característica gustativa <sup>[49]</sup>.

En la última década, la superficie plantada de manzana en México ha permanecido estable. En el 2012, ésta ascendió a 61,486 hectáreas, cuando la producción nacional de manzana registró su récord al alcanzar 698,222 toneladas, nivel que representa un crecimiento de 4.1 % en relación con el año previo <sup>[50, 51]</sup>. La producción de manzana se realiza en 23 estados; sin embargo, solamente 4 concentran más del 80 % en la superficie sembrada, y cosechada (Figura 3); siendo por orden de importancia: Chihuahua, Durango, Coahuila y Puebla <sup>[49]</sup>.

### Figura 3. DISTRIBUCIÓN DE PRODUCCIÓN DE MANZANA EN EL PAÍS.

Elaborada con datos del *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SAGARPA)* 31 de marzo del 2012 <sup>[51]</sup>

■ Chihuahua ■ Durango ■ Coahuila ■ Puebla ■ Resto del país



De acuerdo con el avance de siembras y cosechas de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación <sup>[50, 51]</sup>, la producción de manzana en el estado de Chihuahua, principal entidad productora, se ha reducido debido a problemas de sequía y heladas.

Estos efectos han ocasionado un importante incremento en los precios nacionales de la fruta por lo que los precios del frutal alcanzados en el 2012 son los más altos de los últimos seis años. Por estas razones, muchos productores se vieron en la necesidad de incorporar innovaciones tecnológicas

en sus huertos, entre los cuales se puede encontrar el uso de plaguicidas para el cuidar sus frutos de enfermedades e insectos que pudieran atacarlas <sup>[52]</sup>.

### 1.8.6 Plagas <sup>[45, 50, 52]</sup>.

- **Gorgojo de la flor del manzano (*Anthonomus pomorum*).** Este coleóptero causa daños exclusivamente a las flores del manzano, en cuyo interior habitan las larvas que provocan su destrucción <sup>[45, 50]</sup>.
- **Arañuelo del manzano y del ciruelo (*Hyponomeuta malinellus*).** Esta plaga destruye todas las partes verdes, y no sólo pierde la cosecha, sino que se pone en peligro la vida del árbol al quedar desprovisto de hojas <sup>[50]</sup>.
- **Pulgón lanígero del manzano (*Eriosoma lanigerum*).** Es el enemigo más peligroso de este frutal. Este áfido ataca en el tronco o en las ramas del manzano y, a veces incluso en las raíces. Los pulgones emiten, con su picadura, una saliva, que estimula la formación de tumores y nudosidades, los cuales favorecen la infección del hongo responsable del chancro del manzano <sup>[45, 50, 52]</sup>.
- **Zeuzera y Cossus.** Ponen sus huevos en las fisuras profundas de la corteza del manzano. La Zeuzera ataca a las ramas de unos 3 cm de diámetro, casi nunca al tronco ni a las ramas gruesas. El Cossus suele abrir sus galerías en las ramas gruesas y en el tronco <sup>[50]</sup>.
- **Araña roja (*Tetranychus urticae*).** Varias especies de ácaros, denominados “arañas rojas”, causan daños en el manzano. Pasan el invierno en forma de huevo sobre la corteza, dándole a la madera un color rojo característico <sup>[45]</sup>.
- **Bordadores de las frutas (*Adoxophyes reticulana*, *Pandemis ribeana*).** Se trata de pequeñas mariposas que en estado de larva provocan en los frutos erosiones superficiales irregulares <sup>[45, 50, 52]</sup>.

- **Agusanado de manzanas y peras (*Cydia pomonella*).** En estado de larva se nutre, exclusivamente, de las semillas del fruto en vías de desarrollo o ya maduro. Se alimentan de las hojas hasta llegar a los frutos <sup>[50]</sup>.
- **Cochinilla perniciosa o piojo de San José (*Quadraspidiotus perniciosus*).** En los focos de contagio, la diseminación natural se manifiesta extendiéndose como manchas de aceite alrededor de los primeros árboles atacados y más o menos rápidamente según las condiciones locales de clima y cultivo, densidad de plantación, etc. El contagio se produce por las larvas de primera edad que, llevadas por las aves o arrastradas por el viento, pueden pasar de un árbol a otro <sup>[50, 52]</sup>.
- **Psila común del manzano (*Psylla mali*).** Este insecto segrega una melaza sobre los frutos y hojas, que constituye un excelente medio de cultivo para determinados hongos. La piel de las manzanas queda marcada y oscurecida y en el follaje se desarrollan manchas pardas. Las larvas aparecen en la segunda quincena de marzo y abril, pican los botones florales y provocan su aborto, así como deformaciones en las hojas y más adelante en los frutos <sup>[45]</sup>.
- **Mosca de la fruta (*Ceratitis capitata*).** Es la plaga que más daños produce en los frutales. Este insecto, es una mosca de menor tamaño que la doméstica y de vivos colores. Los primeros síntomas del daño se manifiestan por pequeñas manchas marrones alrededor de la picadura, posteriormente el fruto acaba por reblandecerse y pudrirse con emanación de líquido al exterior <sup>[45, 50, 52]</sup>.

### 1.8.6 Enfermedades

- **Oídio del manzano (*Podosphaera leucotricha* (Ell. et Ev.) E.S. Salmon f.c. *Oidium farinosum*).** El oídio o ceniza es la principal enfermedad que afecta al cultivo de manzano, si bien la importancia dependerá de la sensibilidad varietal. Los síntomas se pueden observar sobre todo el árbol y frutos jóvenes. En cualquiera de ellos el síntoma común es el crecimiento del hongo sobre su superficie que hace que su aspecto sea el de estar cubierto por un polvillo harinoso. Si el ataque es muy intenso y especialmente cuando se elevan las temperaturas puede llegar a producir una caída prematura de la hoja <sup>[45, 50]</sup>.
- **Virosis del mosaico del manzano (*Apple Mosaic Virus*).** Produce manchas cloróticas en las hojas, siendo más visibles en primavera y a principios del verano, bandas blancas en torno a las nerviaciones primarias, y a veces secundarias, y amplias zonas cloróticas que pueden llegar a necrosarse durante el verano <sup>[50]</sup>.
- **Chancro del manzano (*Nectria galligena*).** Originado por un hongo parásito que causa daños muy importantes en ramas y provoca la podredumbre de los frutos. Este hongo encuentra el ambiente favorable para su desarrollo en las zonas de clima húmedo y donde vegeten plantas mal cuidadas. Las lesiones pueden afectar a todos los órganos leñosos, del tronco a las ramas y de las ramas más gruesas a las de un año. Inicialmente, aparecen unas pequeñas manchas, que pueden localizarse, sobre todo, alrededor de cualquier herida producida por los insectos, el granizo, el hielo o por algún instrumento metálico. Alrededor de cada mancha se necrotiza la corteza, que se separa y se desprende, la planta trata de reaccionar formando tejidos cicatrizantes, pero, incluso, esta nueva formación se ve agredida por el hongo <sup>[45, 50]</sup>.

- **Roña o moteado del manzano (*Venturia inaequalis* (Cooke) Winter f.c. *Spilocea pomi* Fr. Ex Fr.).** Es la enfermedad más grave del manzano, teniendo una importancia especial en las regiones de clima muy húmedo. Los síntomas de la enfermedad <sup>[45, 50, 52]</sup>:
  - En las hojas: manchas aceitunadas, oscurecidas y regulares sobre el haz. Cuando el ataque es grave, los tejidos mueren y toman un tinte castaño.
  - Sobre los ramos: el ataque se produce en los ramos todavía verdes. Se forman escamas en la corteza, especialmente en la base de los ramos, y se detiene el crecimiento de éstos.
  - Sobre las flores: el moteado aparece generalmente después de la floración, pero cuando el ataque alcanza a las flores, éstas pueden marchitarse y caer.
  - Sobre los frutos: la enfermedad obstaculiza su desarrollo, se deforman, agrietan y caen. En el mejor de los casos quedan depreciados.
- **Moniliosis (*Monilia laxa* (Aderh. y Ruhl.) Honey).** El daño se produce en la vegetación y en la producción cuando tiene lugar una elevada humedad atmosférica. Las flores son atacadas en plena anthesis y sustituidas por el micelio del hongo y en las ramas se presentan chancros. Estas formaciones cancerosas provocan abundantes exudaciones de goma y la rápida muerte de la parte distal del ramo en el que están insertas. En los frutos de las variedades precoces se desarrolla un moho pardo, sobre el que aparecen granulaciones de color gris <sup>[50]</sup>.

## **II. JUSTIFICACIÓN**

La mayoría de los métodos reportados por las diversas organizaciones a nivel mundial destinadas a evaluar los límites de contaminación por pesticidas en alimentos son por cromatografía de gases, no obstante muchos pesticidas tienen puntos de descomposición bajos lo cual dificulta su cuantificación. Hoy en día existen estudios sobre el empleo de la cromatografía de líquidos (HPLC) para el análisis de residuos de pesticidas, lo que la postula como una opción para el desarrollo de una metodología eficaz en la determinación de este tipo de compuestos en alimentos

## **III. HIPÓTESIS**

Si el método propuesto por HPLC para la identificación de plaguicidas organofosforados se encuentra cercano a los límites de cuantificación y límites de detección que se obtienen en el análisis por GC, entonces será posible utilizar dicha técnica para la cuantificación de plaguicidas organofosforados en frutos pomáceos.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la eficiencia de una metodología analítica alternativa para determinar y cuantificar trazas de plaguicidas organofosforados (clorpirifos, diazinón y malatión) en manzanas, por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección espectrofotométrica UV-Visible (HPLC-UV).

### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Seleccionar las condiciones óptimas para llevar a cabo la separación cromatográfica y la detección de los plaguicidas organofosforados por HPLC-UV.
- Desarrollar un método por la técnica de extracción en fase sólida para extraer de manera selectiva y cuantitativa los plaguicidas organofosforados contenidos en la manzana.
- Optimizar el método de extracción para el análisis de plaguicidas en manzana mediante el establecimiento de los límites de cuantificación, de detección y porcentaje de recuperación.
- Determinar la longitud de onda óptima para la detección.
- Caracterizar cada uno de los plaguicidas en base a sus características físico-químicas.
- Llevar a cabo la aplicación del método desarrollado a muestras de frutos expuestos en el laboratorio a los plaguicidas en estudio.

## V. MATERIALES

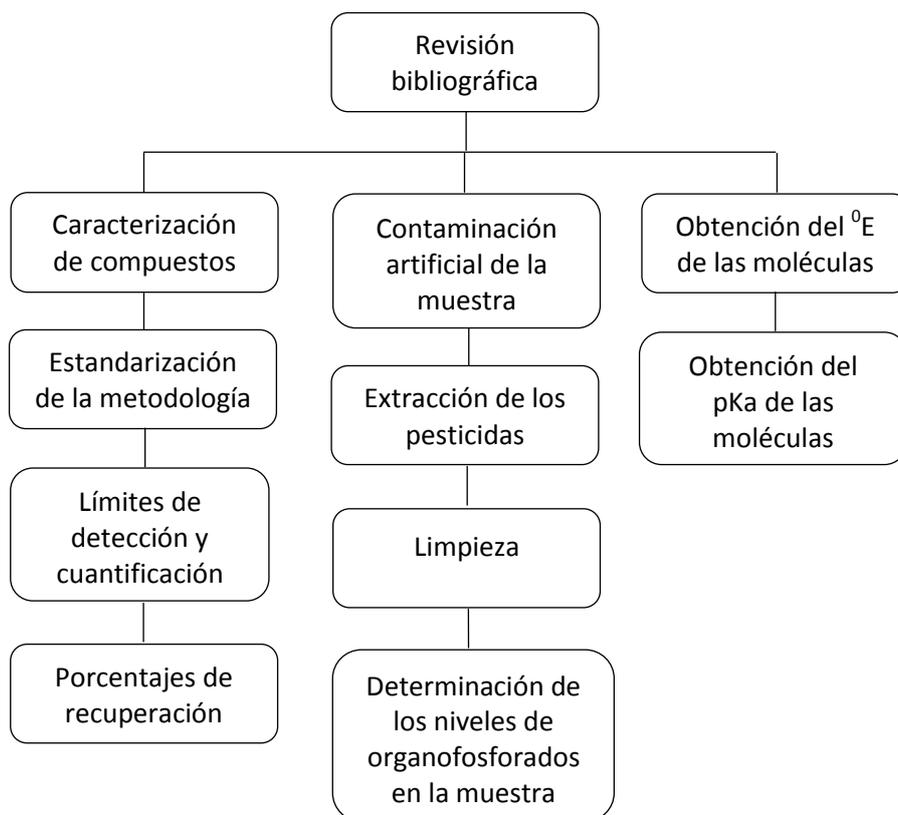


Figura 4. Diagrama de trabajo

**5.1 MUESTRA BLANCO** Las manzanas utilizadas como blanco matriz, a las cuales se les realizó un análisis previo para corroborar que no presentaran residuos de plaguicidas; fueron obtenidas del mercado de la Merced.

### 5.2 DISOLVENTES Y REACTIVOS

Los reactivos y disolventes empleados en el análisis de residuos de pesticidas de las manzanas se muestran en la Tabla 10. Con la finalidad de eliminar algunas impurezas en los disolventes utilizados para la fase móvil (FM), tanto el acetonitrilo como el agua se filtraron a través de membranas Millipor y se desgasificaron por medio de sonicación. Los disolventes se almacenaron a temperatura ambiente en frascos de vidrio protegidos de la luz.

*Tabla 10. Características de los disolventes y reactivos empleados en el análisis de pesticidas*

<b>Disolvente/Reactivo</b>	<b>Pureza (%)</b>	<b>Marca</b>
Acetona	99.5	JT Baker
Acetato de etilo	99.9	JT Baker
Acetonitrilo	99.98	JT Baker
Hexano	99.9	JT Baker
Metanol	99.96	JT Baker
Sulfato de sodio anhidro (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	100	JT Baker

Para realizar las soluciones patrón de pesticidas, se pesó la cantidad de polvo o líquido de cada pesticida y se aforó con acetonitrilo, al igual que los disolventes las muestras se utilizaron filtros MILLEX antes de inyectarlas. Las soluciones patrón se almacenaron en refrigeración a 4 °C. Las características de los pesticidas así como las concentraciones de las soluciones patrón se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11. Características de los pesticidas utilizados como estándares**

<b>Pesticida</b>	<b>Pureza (%)</b>	<b>Marca</b>	<b>Concentración solución patrón (mg/mL)</b>
Clorpirifos	99.9	SIGMA-ALDRICH	10.0
Diazinón	98.3	SIGMA-ALDRICH	10.0
Malatión	97.2	SIGMA-ALDRICH	10.0

A partir de las soluciones patrón, se prepararon soluciones de trabajo en acetonitrilo a diferentes concentraciones. Todas las soluciones de trabajo se mantuvieron en refrigeración a 4°C.

### **5.3 EQUIPO, MATERIAL E INSTRUMENTACIÓN**

Los equipos empleados durante el análisis fueron: Balanza analítica marca OHAUS (modelo EP124C Máx. 210 g d=0.1 mg), Rotavapor marca Buchi R-205, espectro UV/VIS marca PerkinElmer Modelo Lambda 25. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos (HPLC) VARIAN equipado con dos bombas modelo PS 210, un detector de UV – VIS modelo 310, un inyector manual Rheodyne y una Columna Agilent Technologies Tipo ZORBAX Eclipse XDB-C18 4.6 X 150 mm, 5 µm, empleada para el análisis de rutina a nivel trazas de pesticidas.

## **VI. METODOLOGÍA**

### **6.1 CARACTERIZACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO**

Para seleccionar la longitud de onda ( $\lambda$ ) óptima se realizó un barrido (190-1100 nm) de cada uno de los plaguicidas en el Espectro de UV/VIS para conocer la longitud de onda a la cual presentan una mejor absorción, y así poder establecer una longitud de onda de trabajo adecuada para el análisis de los tres pesticidas.

La selección de la composición de la fase móvil óptima para el análisis se basó en el estudio de la retención de los 3 plaguicidas en una columna empacada con fase estacionaria C-18, con diferentes mezclas de entre agua, acetonitrilo y metanol, estableciendo como fase móvil una mezcla de acetonitrilo:agua, en una concentración 90:10. Bajo estas condiciones se logró obtener mejores resultados con respecto a la separación de los picos, aumentando también la resolución de los mismos y teniendo un tiempo de análisis corto.

Mediante inyecciones sucesivas en el cromatógrafo de líquidos (HPLC), se caracterizaron los pesticidas comparándose los tiempos de retención (TR) y áreas de cada uno de los organofosforados del estudio (clorpirifos, diazinón y malatión).

Una vez montada la separación analítica se realizó el estudio de la linealidad con soluciones estándar, a concentraciones en un intervalo de 0.03 a 0.3 mg/mL, a seis diferentes puntos de concentración para cada pesticida; cada solución se inyectó por triplicado y se calculó el coeficiente de correlación (R).

La precisión del sistema se evaluó mediante las áreas de los picos correspondientes a 5 inyecciones de una de las soluciones estándar

preparadas para la curva de linealidad. Con los datos obtenidos se calculó la media (X), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).

El límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) de los plaguicidas se obtuvieron por medio de diluciones sucesivas; considerando al LD como la concentración a la cual el analito proporciona una señal significativa y diferente a la señal dada por la línea base, lo que permite identificar al compuesto en cuestión, y para el caso del LC se refiere a la mínima concentración del analito que nos proporciona una señal clara diferente a la señal de “ruido” de fondo, con la cual se pueda trabajar cuantitativamente. Estos fueron determinados inyectando soluciones cada vez más diluidas de los plaguicidas.

Los porcentajes de recuperación se obtienen al tratar cada uno de los compuestos de interés (de concentración conocida) al procedimiento de extracción, limpieza (SPE) y cuantificación, al cual se somete la muestra de estudio, realizándose también por triplicado.

## **6.2 MUESTRA BLANCO**

Las manzanas exentas de plaguicidas, que fueron utilizadas como blanco matriz, se obtuvieron del mercado de la Merced, con un peso aproximado de 162 a 186 g cada una y se almacenaron en refrigeración (4 °C) hasta su análisis. Para el análisis se determinó que las manzanas utilizadas presentaban un 83 % de humedad. Al realizarse esta determinación se observó que la muestra sufría caramelización, lo que dificultaba el análisis. Por lo que se decidió trabajar en base húmeda. Después de la adquisición la muestra se adecuó, separando las partes no comestibles y cortándose en trozos de menor tamaño para facilitar la molienda. Se utilizaron porciones de  $83.0 \pm 0.10$  g de muestra, las cuales se molieron hasta obtener una mezcla homogénea con consistencia de papilla, que se contaminó con una mezcla de los pesticidas en estudio a una concentración de 6 mg/mL. Todo el estudio fue realizado en base húmeda.

### 6.3 EXTRACCIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS

Diferentes métodos, basados en un disolvente de extracción sencillo, se han utilizado en numerosos trabajos para la extracción de plaguicidas <sup>[43, 53]</sup>, el acetonitrilo, acetato de etilo, metanol y etanol son utilizados con frecuencia para la extracción de pesticidas polares, el acetato de etilo por ejemplo, tiene una polaridad media y la capacidad de extracción de compuestos en un intervalo amplio de polaridad, tal como los pesticidas. Los plaguicidas empleados en el presente estudio presentan diferentes polaridades entre sí pero todos son solubles en acetato de etilo. Clorpirifos y diazinón son ligeramente solubles en agua; malatión es poco soluble en agua. Además, la efectividad de la extracción de residuos de pesticidas empleando acetato de etilo desde matrices vegetales está demostrada en la literatura <sup>[34, 38]</sup>.

La técnica de extracción sólido-líquido consistió en el siguiente procedimiento; Para cada muestra se utilizó una porción representativa de  $83.0 \pm 0.10$  g (base húmeda) de muestra homogenizada y contaminada (media manzana), dejándose atemperar por aproximadamente 20 a 30 min. Se pesaron 5.0 g de pulpa y se mezclaron con 50.0 mL de acetato de etilo. Se agito durante 4 hrs. En parrilla de agitación a temperatura ambiente. Se deja sedimentar la muestra durante media hora y el extracto obtenido se filtra a través de un embudo con sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua que pudiera haber arrastrado el acetato de etilo y materia sólida perteneciente a la muestra. El extracto obtenido se evaporó hasta sequedad en rotavapor a vacío a una temperatura de 48 a 50 °C, la muestra se redisolvió con 2.0 mL de hexano <sup>[39, 54]</sup>.

## **6.4 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE) O LIMPIEZA**

Al analizar pesticidas en alimentos a nivel trazas, frecuentemente se tiene en la muestra la remoción de materia orgánica de altos pesos moleculares y en mayores proporciones comparados con el analito de interés, los cuales pueden interferir con el estudio. Con el fin de eliminar impurezas de la matriz tales como colorantes, lípidos, hidratos de carbono y proteínas se usan pasos de limpieza adicionales para aumentar la selectividad del método de extracción y minimizar las interferencias durante la identificación, como la extracción en fase sólida (SPE) la cual se empleó en este trabajo. A todas las muestras se les realiza un clean-up con cartuchos de florisil <sup>[39, 42, 53-55]</sup> en una cámara de SPE antes del análisis por HPLC. El cartucho se activa eluyendo 50.0 mL de hexano. El extracto de manzana redissuelto (2.0 mL) en hexano se transfiere al cartucho, el cual se eluye con 50.0 mL de hexano:acetona (90:10) para el análisis. La fase orgánica obtenida se evapora a sequedad en rotavapor a una temperatura de 45 a 50 °C. El residuo seco se redissolvió en 1.0 mL de acetonitrilo y se mantiene en refrigeración (4 °C) hasta su análisis por HPLC.

## **6.5 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN**

Una vez realizada la extracción y limpieza de cada una de las muestras, se procedió a la separación e identificación de cada uno de los plaguicidas mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) con detector de UV-VIS. Las muestras se inyectaron manualmente utilizando un sistema isocrático (acetonitrilo:agua 90:10), con inyecciones de 20 µL, flujo de 1.0 mL/min y una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 205 nm.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La importancia de proponer un método alternativo para el análisis de matrices alimentarias se debe a que oficialmente la única metodología empleada para la detección y cuantificación de este tipo de compuestos es por medio de la Cromatografía de Gases (GC), por lo que se propuso como método alternativo la cromatografía de líquidos (HPLC).

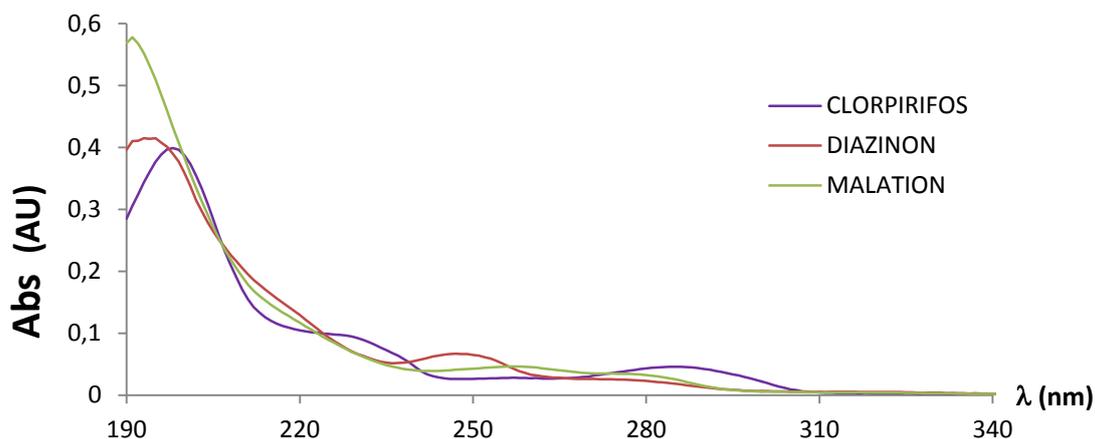
En la estandarización de las técnicas de extracción y cuantificación se obtuvieron los siguientes resultados.

### 7.1 DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA ÓPTIMA PARA LA DETECCIÓN

La espectroscopia ultravioleta-visible (UV/VIS) es una espectroscopia de emisión de fotones. Utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta cercano (UV) e infrarrojo cercano (NIR) del espectro electromagnético. La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas, por medio de la cuales se puede identificar algunos grupos funcionales de las moléculas, así como su conformación.

Para fines prácticos es conveniente mencionar la clasificación convencional de los orbitales moleculares en la capa de valencia de los compuestos orgánicos.

- Los orbitales tipo  $\sigma$  se dan cuando se tienen presentes enlaces sencillos de tipo C–H o C–C, teniendo un carácter fuertemente enlazante.
- Los orbitales  $\pi$  indican la presencia de enlaces múltiples (cromóforos, compuestos con insaturaciones y sistemas aromáticos, entre otros).
- Los orbitales tipo  $n$  describen pares de electrones libres asociados con heteroátomos (O, S, N).

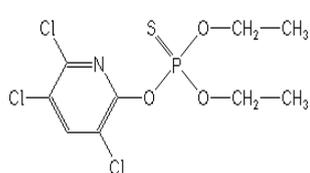


**Figura 5.** Longitudes de onda de absorción en la región UV para los diferentes compuestos en estudio.

Analizando los picos que aparecen en los espectros obtenidos (Figura 5) se puede decir que las moléculas presentan tres estados de transición. Los cuales indican los enlaces y conformación que tienen los compuestos. Estos picos se encuentran en la región que va del UV lejano – UV próximo.

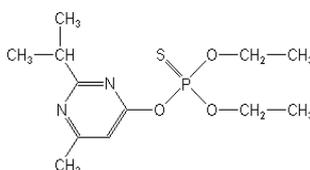
Los estados de transición presentes en las moléculas son:

**Clorpirifos:**



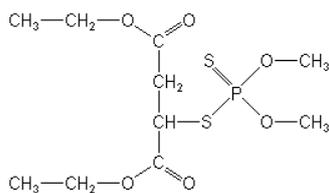
- $n \rightarrow \sigma^*$  Enlaces sencillos unidos a heteroátomos R-C-Cl
- $\pi \rightarrow \pi^*$  Dobles ligaduras R-C=C-R
- $n \rightarrow \pi^*$  Enlaces múltiples unidos a heteroátomos R-C=N-R

**Diazinón:**



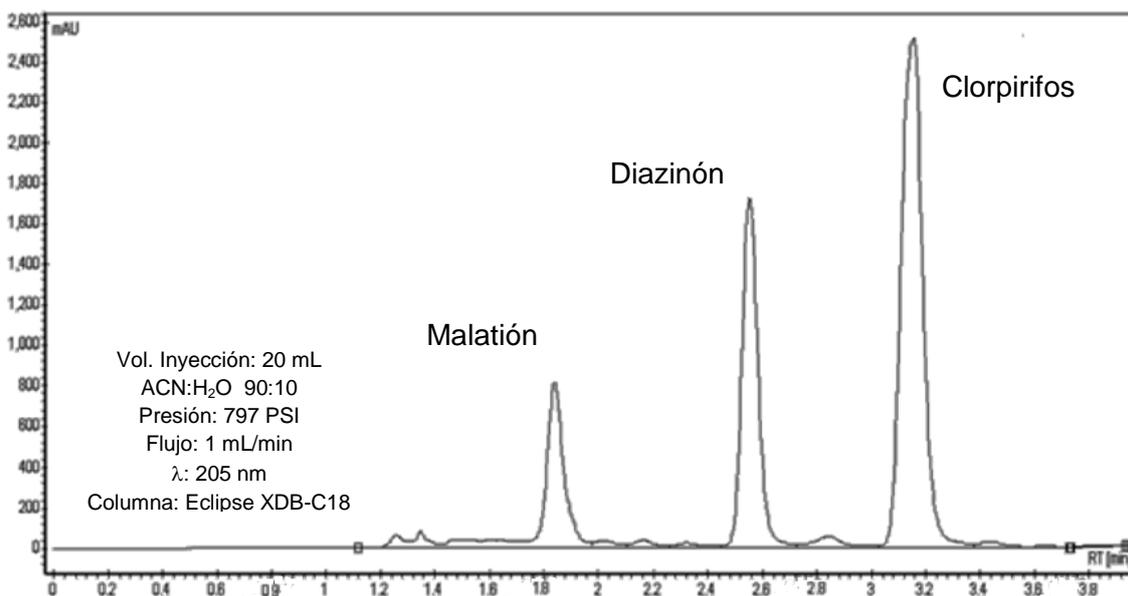
- $\sigma \rightarrow \sigma^*$  Enlaces sencillos de tipo H-C-C-H y C-H
- $\pi \rightarrow \pi^*$  Dobles ligaduras R-C=C-R
- $n \rightarrow \pi^*$  Enlaces múltiples unidos a heteroátomos R-C=N-R

**Malatión**

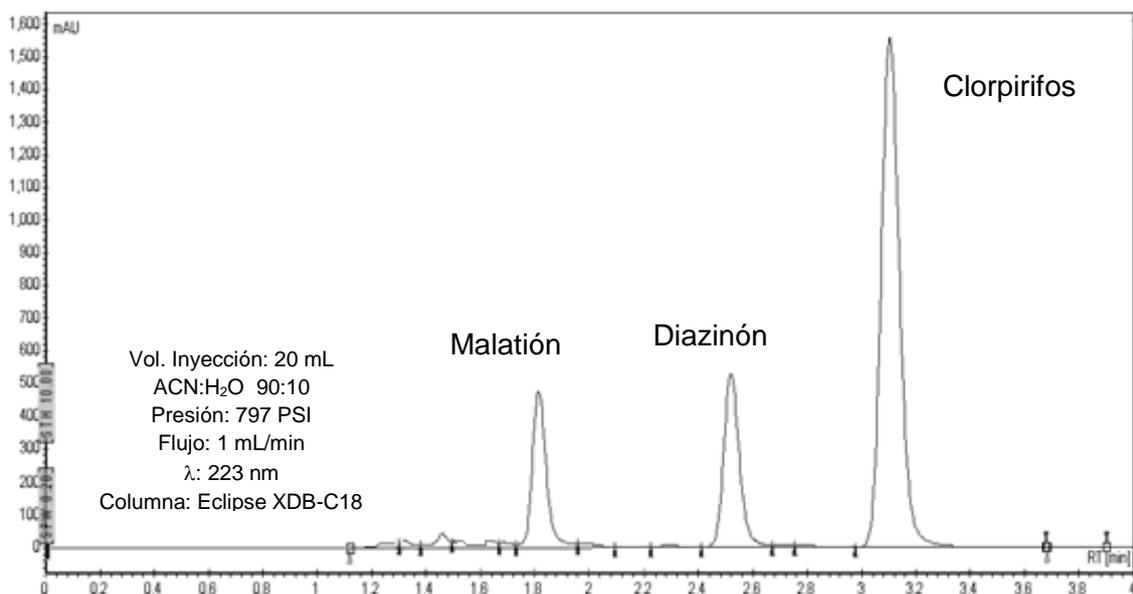


- $\sigma \rightarrow \sigma^*$  Enlaces sencillos de tipo H-C-C-H y C-H
- $n \rightarrow \sigma^*$  Enlaces sencillos unidos a heteroátomos H-C-O
- $n \rightarrow \pi^*$  Enlaces múltiples unidos a heteroátomos R-C=O

De igual forma al observar los espectros de absorción de los plaguicidas en estudio se puede apreciar que la mayoría de ellos muestran más de un máximo de longitud de onda de absorción ( $\lambda$ ) en un rango que va de los 200 nm a 313 nm. Para poder realizar el estudio de los tres plaguicidas simultáneamente, era necesario encontrar una longitud de onda a la cual se asegurara que absorbieran los tres compuestos, por lo que al realizar el scanning de los tres plaguicidas se encontró que a las longitudes de onda de 205 nm y 223 nm se tiene una convergencia de los tres plaguicidas, lo que indica que a esas longitudes de onda los tres compuestos presentarán una buena absorción al realizar el análisis simultaneo de los tres compuestos. Por lo que se realizó el estudio de identificación de los compuestos en mezcla a estas longitudes de onda, para así conocer cuál era la optima en la determinación simultánea de los plaguicidas (Figuras 6, 7).



**Figura 6.** Cromatograma para determinar la longitud de onda de trabajo, realizado a 205 nm.



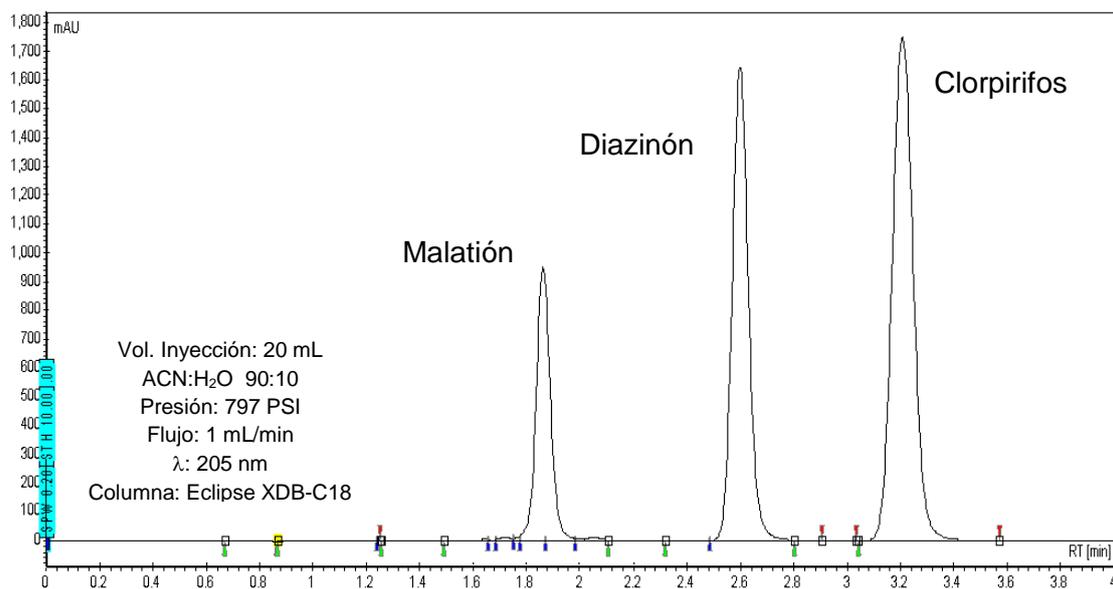
**Figura 7.** Cromatograma para determinar la longitud de onda de trabajo, realizado a 223 nm.

En base a los cromatogramas obtenidos se eligió la longitud de onda de 205 nm, ya que en estas condiciones los plaguicidas presentan una mejor absorptividad.

## 7.2 SELECCIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA FASE MÓVIL

Los tres disolventes con los cuales se sugiere trabajar en un análisis de este tipo son metanol, agua y acetonitrilo.<sup>[53-57]</sup> Al inicio del trabajo se seleccionó como fase móvil acetonitrilo:agua (70:30), tomando en cuenta los trabajos revisados para montar el experimento<sup>[35, 53, 55]</sup>; además de plantear que al ser los compuestos de tipo hidrofóbicos, y trabajando con una fase móvil acuosa se podría tener una mejor separación de los compuestos, al igual que una mejor resolución. Los resultados obtenidos no fueron del todo favorables ya que se tenían tiempos de corrida de 45 minutos y la resolución que presentaron los picos de cada compuesto no eran del todo buena. Por lo cual se realizó una variación en los gradientes de la fase móvil, hasta encontrar las concentraciones óptimas (ACN:H<sub>2</sub>O 90:10) a trabajar de cada disolvente. Con

esto se logró disminuir la polaridad de la fase móvil, y así obtener un menor tiempo de análisis, una buena separación de los picos y mejorar la resolución de los mismos, como se puede apreciar en la figura 8.



**Figura 8.** Cromatograma correspondiente a la inyección de una mezcla de estándar de los tres plaguicidas a una concentración 0.5 mg/mL cada uno.

## 7.3 CARACTERIZACIÓN

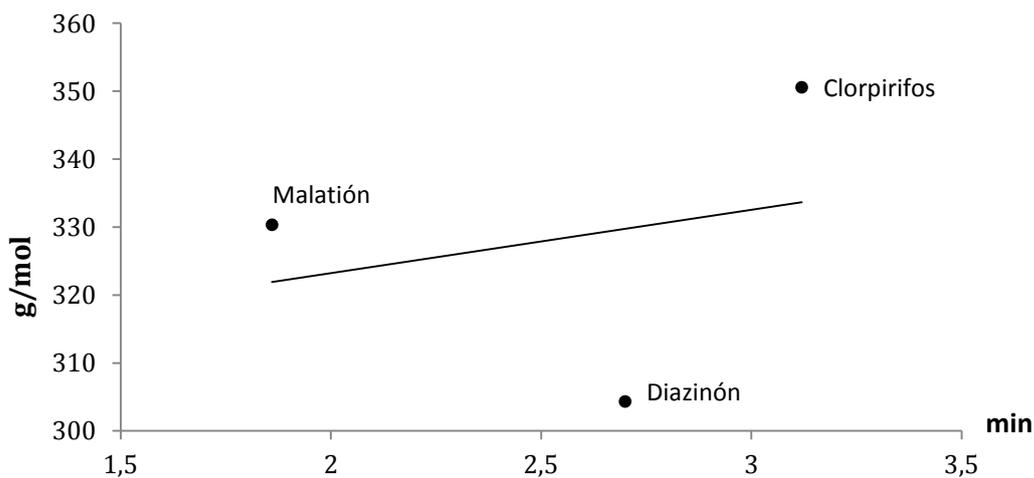
El tiempo de retención de cada compuesto se puede estudiar en base a parámetros fisicoquímicos característicos de cada molécula como pueden ser su peso molecular, polaridad, pKa, dureza, entre otros valores. En el presente trabajo se busco evaluar el tiempo de retención de cada plaguicida en base a estos parámetros para así entender y explicar las características de cada molécula.

### 7.3.1 PESO MOLECULAR VS TIEMPO DE RETENCIÓN

Se sabe que entre mayor sea el tamaño del compuesto más tiempo tardará en salir de la columna debido al impedimento estérico que se presenta por parte de la molécula al ser eluida. Para comprobar este parámetro se realizó una comparación entre el tiempo de retención y el peso molecular de los plaguicidas empleados (gráfica 2).

**Tabla 12.** Valores de peso molecular y tiempos de retención de los plaguicidas.

<b>Plaguicida</b>	<b>Peso molecular (g/mol)</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>
Clorpirifos	350.59	3.12 ± 0.3
Diazinón	304.35	2.7 ± 0.2
Malatión	330.36	1.86 ± 0.2



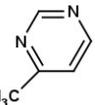
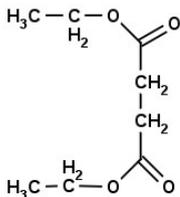
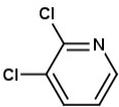
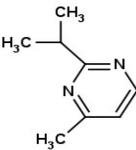
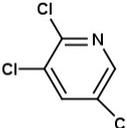
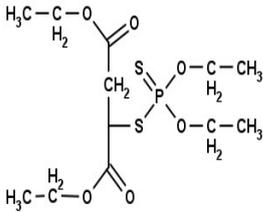
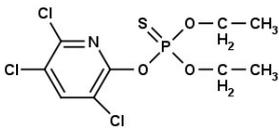
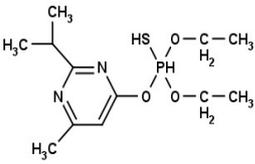
**Figura 9.** Tiempo de retención en función del peso molecular.

En base a los datos presentados en la tabla 12 con respecto al peso molecular de cada plaguicida se esperaría que el orden de aparición fuera diazinón-malatión-clorpirifos, teniendo así una gráfica lineal ascendente, sin embargo, como se observa en el cromatograma presentado anteriormente (figura 4) el primer compuesto en ser eluido de la columna es el malatión. La razón de que este sea el primero en salir y no el diazinón tiene que ver con la estructura que presentan las moléculas. Los compuestos con los que se trabajó son hidrocarburos derivados del ácido fosfórico; siendo el diazinón y el clorpirifos compuestos de tipo heterocíclicos mientras que el malatión presenta una conformación de tipo alifática. Por lo que se puede pensar que al presentar el diazinón una conformación de tipo cíclica tendrá mayor impedimento conformacional al pasar por la columna, a diferencia del malatión que al no estar ciclada podría acomodarse mejor para poder pasar más rápido y de esta forma presenta un menor tiempo de retención. Tomando en cuenta lo antes mencionado, podemos observar que en la grafica realizada del peso molecular contra el tiempo de retención (figura 9) los compuestos presentan cierta tendencias lineal. Por lo que podría decir que el peso molecular no es uno de los parámetros que más influye en el estudio con respecto a tiempo de retención de cada compuesto.

### 7.3.2 pKa VS TIEMPO DE RETENCIÓN

La definición que se tiene de pKa es la siguiente. “pKa es la fuerza que tienen las moléculas de disociarse”. Una forma conveniente de expresar la relativa fortaleza de un ácido es mediante el valor de su pKa, valores pequeños de pKa equivalen a valores grandes de Ka (constante de disociación) y, a medida que el pKa decrece, la fortaleza del ácido aumenta [58].

Sabiendo esto, podemos deducir que cuanto menor sea el valor de pKa del plaguicida será más ácido por lo que se disociará más fácilmente en el agua. Al estar compuesta la fase móvil por una pequeña parte de agua (90:10 ACN:H<sub>2</sub>O), puede decirse que el plaguicida que aparecerá primero es el presente un valor de pKa bajo y por lo tanto el más ácido de los tres, por lo que irán apareciendo según su valor de pKa.

Compuesto	pKa	Compuesto	pKa	Compuesto	pKa
<b>Clorpirifos</b>		<b>Diazinón</b>		<b>Malatión</b>	
	5.12		1.58		
	1.13		2.48		-6.74
	-0.38		3.16		
	-2.29				-6.82
	<b>-4.24</b>		<b>-4.06</b>		

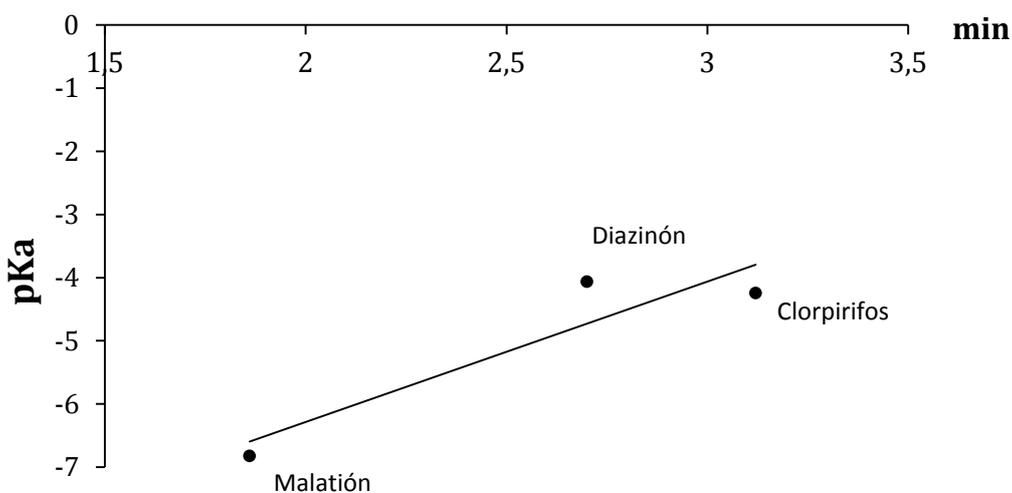
**Tabla 13.** Valor de pKa con respecto a los sustituyentes en la molécula, obtenidos con ayuda del programa MarvinSketch.<sup>[59]</sup>

Como se puede observar en la tabla 13 la acidez de compuesto cambia con forme aumenta su número de átomos. Ya sea que esto haga que la molécula se haga más ácida, como en el caso del clorpirifos que al ir aumentando el número de sustituyentes cloro se observa una disminución en su valor de pKa. Esto es debido a que los átomos de cloro hacen que la molécula sea más estable, ya que estos al ser más electronegativos atraen con mayor facilidad a los electrones, haciendo así que a la molécula le sea más difícil donar electrones, logrando con esto aumentar la acidez del compuesto. Finalmente se puede observar que el grupo fosfato en la molécula hace que disminuya aún más el valor de pKa del ahora plaguicida, teniendo así un valor de -4.24.

En el diazinón, los sustituyentes metilo hacen que la molécula presente un comportamiento diferente al observado con el clorpirifos. En este caso los metilos son menos electronegativos que la piridina, por lo que los electrones de estos van a ser atraídos hacia el anillo aromático, aumentando así el valor de pKa de la molécula y por lo tanto haciéndola menos ácida. Pero como podemos observar en la tabla este valor cambia drásticamente de igual forma que en el clorpirifos, al unirse el grupo fosfato al compuesto.

Con el malatión la estructura base o de la que partimos es de un ácido dicarboxílico, el cual ya presenta un valor de pKa bajo, debido a que en este caso los oxígenos están atrayendo con mayor fuerza los electrones del enlace con el carbono haciendo que la molécula sea muy ácida, aumentando esta característica, la adición del grupo fosfato, dando el valor de pKa más bajo de los tres plaguicidas y caracterizándolo así como el más ácido, siendo así el primero en salir de la columna.

En la Figura 10 se presenta la tendencia que siguen los plaguicidas con respecto a sus valores de pKa.



**Figura 10.** Tiempo de retención en función del pKa.

Como se puede observar en la gráfica los compuestos siguen una tendencia, aunque el diazinón se encuentra un poco desplazado, al presentar el valor de pKa más alto de los tres, a pesar de ser el segundo plaguicida en ser eluido de la columna.

En los valores obtenidos de pKa se tiene, que el clorpirifos es un compuesto más ácido que el diazinón, por lo cual este debería salir antes que el diazinón. La razón por la cual ocurre esto es debido a la conformación que presenta la molécula del plaguicida. Como se mencionó anteriormente y como se puede observar la molécula del clorpirifos presenta tres átomos de cloro rodeando la molécula, los cuales al ser más electronegativos van a atraer con mayor fuerza los electrones libres que tenga la molécula, dándole mayor estabilidad al anillo y presentando así un carácter más ácido; contrario a lo que pasa con el diazinón el cual presenta sustituyentes metilo, que al ser menos electronegativos que los nitrógenos del anillo van a perder sus electrones, haciendo más electronegativo al anillo y otorgándole así un carácter más básico, por lo cual su valor de pKa va a ser más alto que el de el clorpirifos. Además de esto, la fuerza de un ácido se refiere a su habilidad o tendencia a perder un protón, por lo que si analizamos las estructuras de los pesticidas con los cuales se trabajó podemos decir que, en efecto el malatión es el primero en salir por el hecho presentar una estructura alifática lo cual hace más fácil el

hecho de que pueda donar sus  $H^+$  más fácilmente, y siguiendo esta tendencia el siguiente en aparecer es el diazinón, que aún que presente un valor más alto de pKa que el clorpirifos, los metilos que se encuentran presentes en su anillo aromático le otorgan una mayor fuerza, al poderse desprotonar más fácilmente y por ende disociarse mejor que el clorpirifos el cual presenta como sustituyentes del anillo aromático  $Cl^-$ , que en este caso reducen la desprotonación de la molécula.

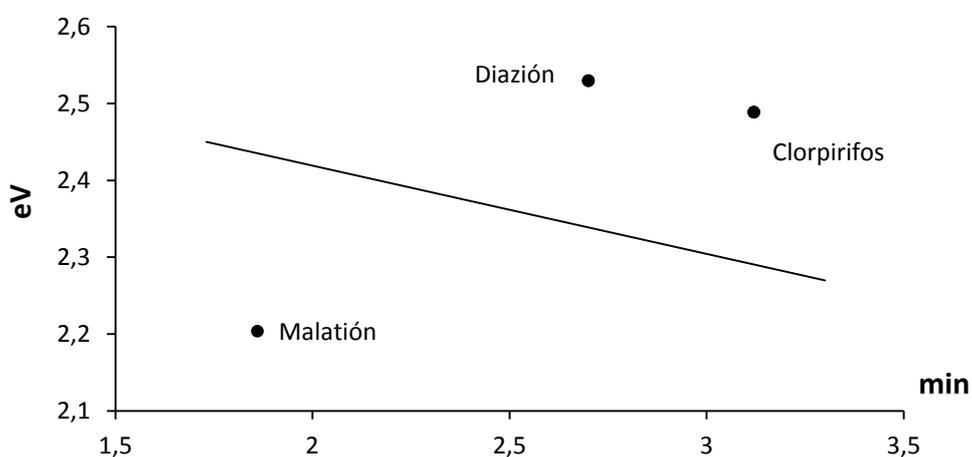
### 7.3.3 DUREZA VS TIEMPO DE RETENCIÓN

La teoría ácido-base duro-blando, también conocida como teoría ABDB, concepto ácido-base de Pearson o teoría HSAB (por sus siglas en inglés) es un modelo ampliamente utilizado en química para explicar la estabilidad de los compuestos y mecanismos de reacción. Esta teoría asigna los términos 'duro' o 'blando', y 'ácido' o 'base' a las especies químicas. Se aplica el término 'duro' a aquellas especies que son pequeñas, tienen estado de oxidación o carga electronegativa alta (el criterio de carga se aplica principalmente a los ácidos, aunque también en menor grado a las bases), y son débilmente polarizables. Se aplica el término 'blando' a aquellas especies que son grandes, tienen estado de oxidación o carga electronegativa baja, y son fuertemente polarizables <sup>[60]</sup>.

En la Tabla 14 podemos observar los valores de dureza calculados para cada uno de los plaguicidas, los cuales se graficaron contra su tiempo de retención (Figura 11), para de esta forma observar cómo podrían estar asociadas estas características en el análisis de los compuestos.

**Tabla 14.** Valores de dureza y tiempos de retención de los plaguicidas.

Plaguicida	Dureza	Tiempo de retención (min)
Clorpirifos	2.489	3.12 ± 0.3
Diazinón	2.53	2.7 ± 0.2
Malatión	2.204	1.86 ± 0.2



**Figura 11.** Tiempo de retención con respecto a la dureza

En la Figura 11 podemos apreciar que con respecto a la dureza los compuestos siguen una tendencia decreciente. En este caso se tiene que el malatión sale un poco de esta tendencia. Esto puede ser explicado en base a los conceptos revisados anteriormente con respecto a la dureza de un compuesto los cuales nos dicen que, algunos de los parámetros a los cuales está asociado son el tamaño de la molécula y su densidad electrónica con forme a estos, se verá modificada la dureza de un compuesto, por lo cual este tardará más o menos en ser excluido de la columna. Tomando en cuenta lo antes mencionado, en la Tabla 15 se presentan los valores de

electronegatividad y dureza de los plaguicidas buscando explicar los resultados obtenidos.

**Tabla 15.** Valores de dureza, densidad electrónica y peso molecular de los plaguicidas.

<b>Plaguicida</b>	<b>Dureza</b>	<b>Densidad Electrónica</b>
Clorpirifos	2.489	$8.573 e^{-2}$
Diazinón	2.53	$9.150 e^{-2}$
Malatión	2.204	$7.939 e^{-2}$

Como se sabe, entre más electronegativo sea un compuesto mayor será su dureza, y como se puede ver en la tabla anterior de las tres moléculas la más electronegativa es la del diazinón, seguido por el clorpirifos y teniendo al malatión como el compuesto menos electronegativo de los tres. Retomando la explicación que se dio para los valores obtenidos de pKa, la estructura base de los plaguicidas es la que va a tener mayor influencia en las propiedades físico-químicas de cada uno, las cuales se van a ver reflejadas en los valores obtenidos. En este caso, como se había mencionado, en la molécula del clorpirifos los electrones se van a ver atraídos hacia los átomos de cloro, dándole mayor electronegatividad a la molécula en esa zona, causando una deficiencia electrónica en el anillo aromático lo que le da valores menores de electronegatividad que los obtenidos para el clorpirifos, el cual los electrones se atraen con mayor fuerza hacia los sustituyentes nitrógenos del anillo, haciendo que sea mayor la nube electrónica en esta zona y teniendo con esto un valor de electronegatividad mayor en el anillo aromático. Por otra parte los oxígenos y el azufre presentes en su grupo fosfato van a tener influencia en la nube electrónica de las moléculas. En el caso del malatión se aprecia que a pesar de ser el primer compuesto en ser excluido de la columna, es el que presenta el valor más pequeño de dureza y electronegatividad, debido a los enlaces que presenta su estructura, hace que los electrones en su capa se encuentren más distribuidos en la molécula.

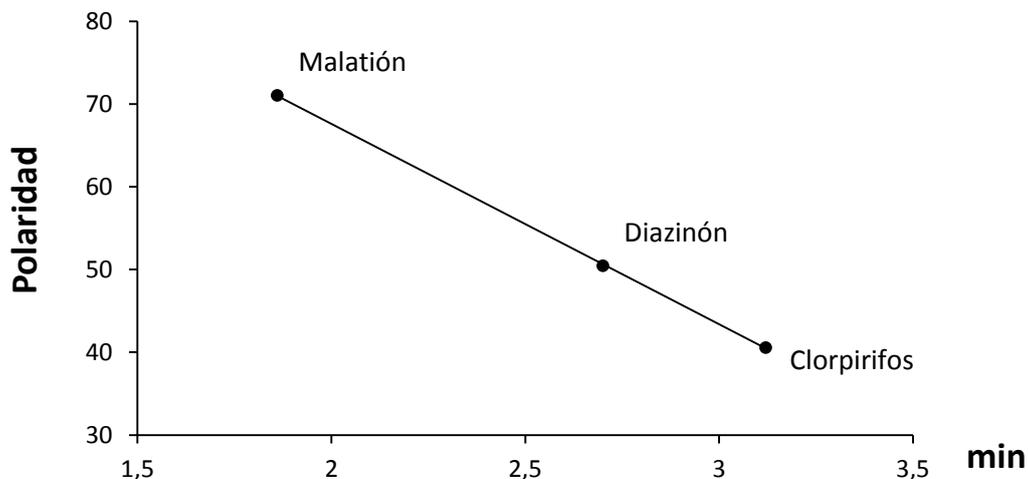
La razón por la cual los valores obtenidos no concuerdan con el tiempo de retención de este plaguicida es que, como se puede observar en la tabla 13, tanto el diazinón como el clorpirifos presentan similitud en su estructura, son moléculas de tipo heterocíclico, por lo cual comparten ciertas tendencias y características. Ha diferencia del malatión que presenta una estructura alifática, lo que le otorga características diferentes, debido a lo cual no se podría realizar una comparación con respecto a la dureza, entre estas moléculas, aunque los tres compuestos pertenezcan al mismo grupo de plaguicidas organofosforados.

### 7.3.4 POLARIDAD VS TIEMPO DE RETENCIÓN

Los plaguicidas estudiados presentan diferentes tiempos de retención, que se encuentran relacionados directamente con su polaridad, la cual les confiere diferente afinidad a la fase móvil y estacionaria. Teniendo en cuenta que los compuestos estudiados son poco polares, esta característica hace que tengan una mayor afinidad por la fase estacionaria (columna C18), que por la fase móvil (ACN:H<sub>2</sub>O 90:10), que es mas polar que la fase estacionaria. Por lo que entre menor sea la polaridad del compuesto su tiempo de retención será mayor. Dicho esto se busco conocer la polaridad de cada plaguicida y compararla con el tiempo de retención que presenta cada uno (tabla 16), para así corroborar que el tiempo de retención de la molécula está determinado por su polaridad.

**Tabla 16.** Valores de polaridad y tiempos de retención de los plaguicidas.

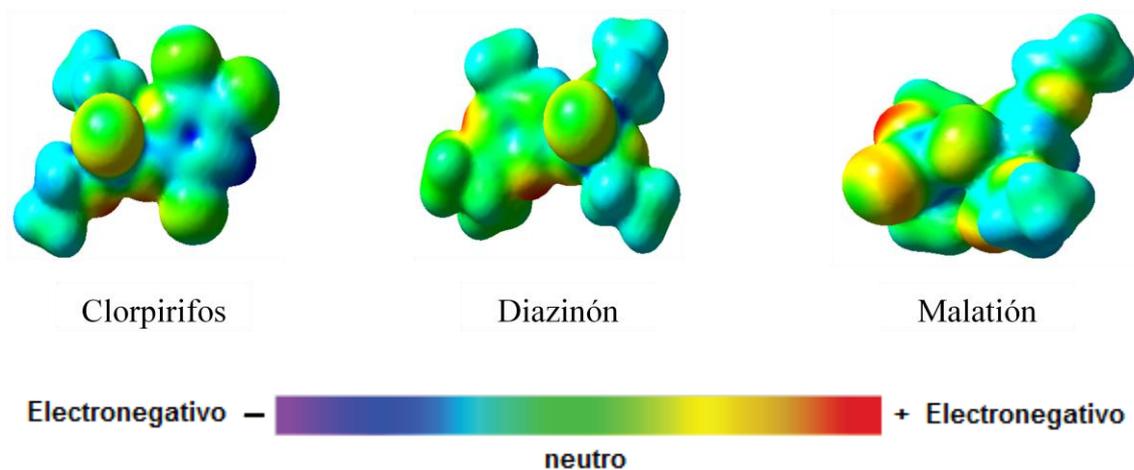
Plaguicida	Polaridad	Tiempo de retención (min)
Clorpirifos	40.58	3.12 ± 0.3
Diazinón	50.58	2.7 ± 0.2
Malatión	71.06	1.86 ± 0.2



**Figura 12.** Tiempo de retención en función de la polaridad

Los datos obtenidos dan como resultado una pendiente decreciente, como se puede observar en la Figura 12, la cual indica que la polaridad es una propiedad es inversamente proporcional al tiempo de retención de cada molécula, en las condiciones establecidas para este análisis.

La literatura<sup>[61]</sup> nos dice que, la polaridad es una propiedad de las moléculas que determina la separación de las cargas eléctricas en la misma. Al formarse una molécula orgánica el tipo de enlaces que une a los átomos son los enlaces covalentes, en este tipo de enlaces, los electrones tienden a desplazarse hacia el átomo que tiene mayor electronegatividad. El enlace será tanto más polar cuanto mayor sea la diferencia entre las electronegatividades de los átomos que se enlazan. En base a esto se puede explicar porque el malatión es el compuesto con mayor polaridad y el clorpirifos es el de menor polaridad; para poder tener una mejor perspectiva con respecto a este punto se modelaron los plaguicidas por medio del programa Gaussian 09<sup>[62]</sup> en la cual se busco conocer la morfología de cada compuesto como se puede observar en la figura 13.



**Figura 13.** Mapas de potencial electrostático de los plaguicidas.<sup>[62]</sup>

Al analizar el potencial electrostático de las tres moléculas se puede observar, que como se había mencionado antes, los sustituyentes cloro en la molécula del clorpirifos disminuyen la densidad electrónica dentro del anillo (aparición del color azul), haciendo que la molécula sea menos polar. Para el diazinón se tiene que la mayoría de los electrones se van a encontrar en el anillo, cercanos a los enlaces nitrógeno, lo que le va a dar un carácter más neutro a la molécula en esa zona. En el malatión se tiene una mayor cantidad de enlaces covalentes. Los de menor electronegatividad son los formados por los enlaces estrés en su cadena alifática, en los cuales al estas dos oxígenos va a atraer con mayor fuerza a los electrones, formando dipolos eléctricos en esa zona. De igual forma en el grupo fosfato de la molécula los electrones del fosforo van a ser atraídos hacia los oxígenos y azufres del enlace. Se puede observar que los oxígenos unidos a este fosforo presentan una mayor electronegatividad (aparición del color rojo), debido a que también están atrayendo los electrones del grupo metilo unos a ellos lo que les da una mayor electronegatividad. Todos estos momentos dipolares que presenta la molécula del malatión hacen que sea esta el compuesto con mayor polaridad de los tres. En base a esto y tomando en cuenta que se utilizó una columna de fase reversa (fase apolar), el tiempo de retención de las moléculas menos polares es mayor que el de las moléculas polares, debido a las interacciones hidrofóbicas que resultan por la fuerzas de repulsión entre la fase móvil, los compuestos (clorpirifos, diazinón y malatión) y la columna.<sup>[63]</sup>

### 7.3.5 ESTUDIO ELECTROQUÍMICO

El empleo de la voltamperometría cíclica en el presente trabajo, tiene como finalidad determinar las propiedades redox de los compuestos organofosforados como los potenciales de media onda ( $E_{1/2}$ ), con objeto de conocer la estabilidad de los compuestos estudiados. El estudio se efectuó en una celda electroquímica compuesta de tres electrodos: electrodo de referencia ( $\text{AgBr-Ag}^0$ ), electrodo de trabajo (carbón vítreo) y electrodo auxiliar ( $\text{Pt}^0$ ); empleando como disolvente acetonitrilo y  $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3]_4\text{NPF}_6$ , ( $\text{Bu}_4\text{NPF}_6$ ) 0.10 M como electrolito soporte.

La carga incidida en la solución del electrolito soporte, en el cual se encuentra disuelto el compuesto, hace que se produzcan reacciones de oxidación-reducción las cuales se pueden identificar con la aparición de picos en el voltamperograma. Esta determinación se realizó con el propósito de corroborar la estabilidad entre los pesticidas estudiados, ya que como se sabe algunos de los plaguicidas al descomponerse llegan a formar compuestos más tóxicos. En este caso lo que podemos apreciar es la descomposición de los plaguicidas en estudio por medio de la oxidación de los mismos. Una vez fijado el valor de potencial al cual se realizará la medición se determina la corriente necesaria para que se produzca la oxidación del compuesto. La cantidad de corriente que requiera un compuesto es proporcional a su facilidad de descomposición.

En las Figuras 14 a, b y c se muestran los voltamperogramas de los plaguicidas obtenidos sobre el electrodo de carbón vítreo.

## Clorpirifos

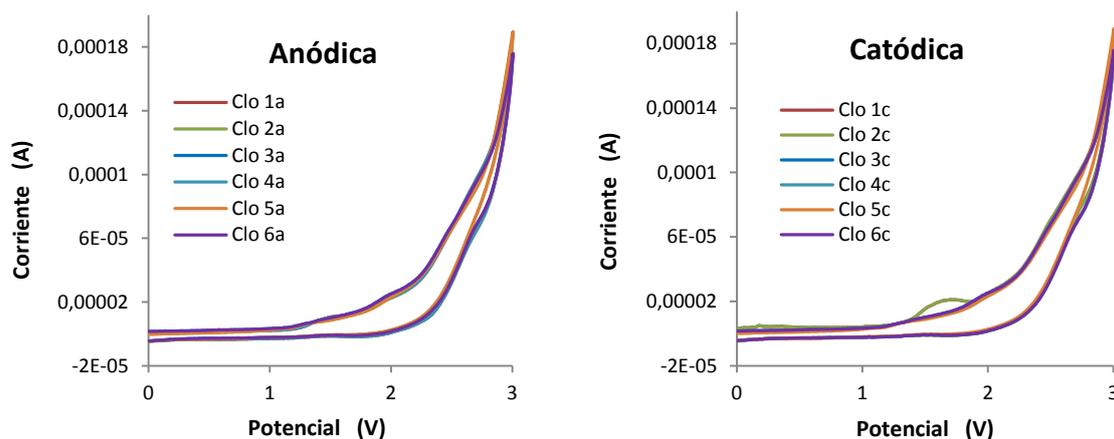


Figura 14 a. Voltamperometrías cíclicas para 1mM de Clorpirifos

## Diazinón

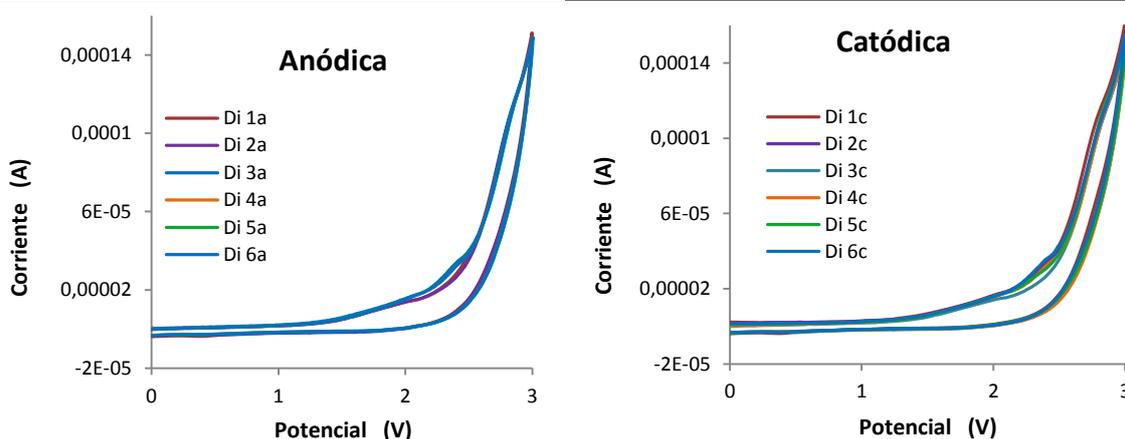


Figura 14 b. Voltamperometrías cíclicas para 1mM de Diazinón.

## Malatión

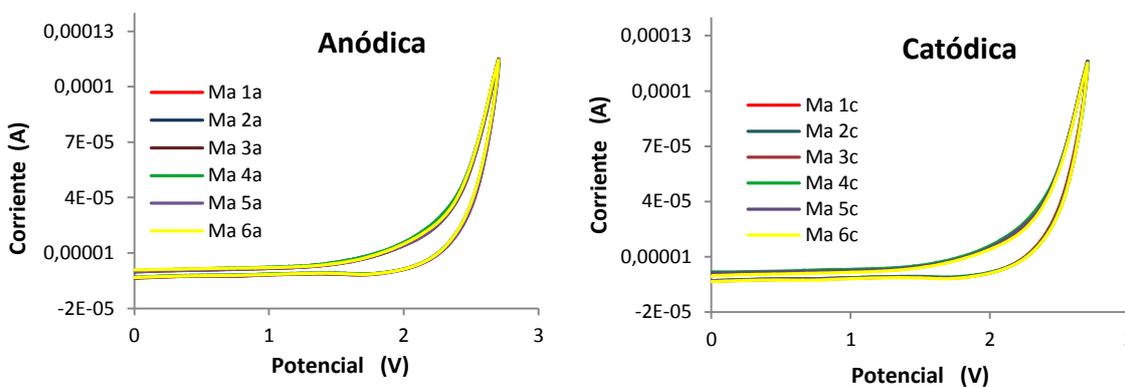


Figura 14 c. Voltamperometrías cíclicas para 1 mM de Malatión.

Analizando los voltamperogramas obtenidos se aprecia que de los tres plaguicidas en estudio el que requiere una menor cantidad de corriente es el malatión por lo que se puede decir que es el compuesto que se descompone más fácilmente de los tres estudiados, seguido del Diazinón y siendo el clorpirifos el que más tarda en descomponerse. Esto se debe a la conformación que presentan las moléculas ya que el diazinón y el clorpirifos siendo moléculas cicladas presentan mayor estabilidad en sus enlaces al incidirles carga, sin en cambio en el caso del malatión que tiene una estructura alifática hay una mayor facilidad de romper los enlaces de la molécula. En el caso del clorpirifos como se ha mencionado anteriormente los cloros que rodean a la molécula son los que le brindan mayor estabilidad, haciendo que tarde más tiempo en degradarse, por lo que se puede decir que es el más estable y es el que presenta una mayor persistencia en el medio ambiente como se puede apreciar en la Tabla 17.

**Tablas 17.** Persistencia de los plaguicidas en el ambiente

Plaguicida	Persistencia	DT <sub>50</sub>	
		Suelo	Agua
Clorpirifos	Moderadamente persistente	60 a 120 días	3.5 a 20 días
Diazinón	Poco persistente	2 a 4 semanas	5 a 15 días
Malatión	Ligeramente persistente	1 a 25 días	1 a 6 semanas

## 7.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

### 7.4.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN DE ESTÁNDARES

Se lograron identificar los plaguicidas en base a sus tiempos de retención (TR) obtenidos de los cromatogramas realizados, como se puede apreciar en la Figura 15.

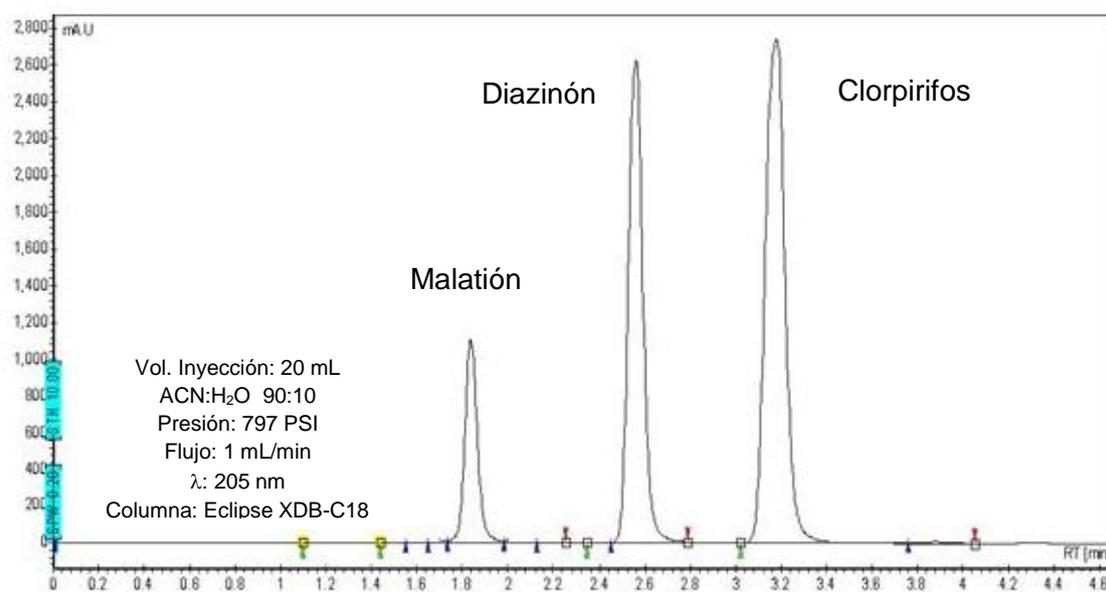


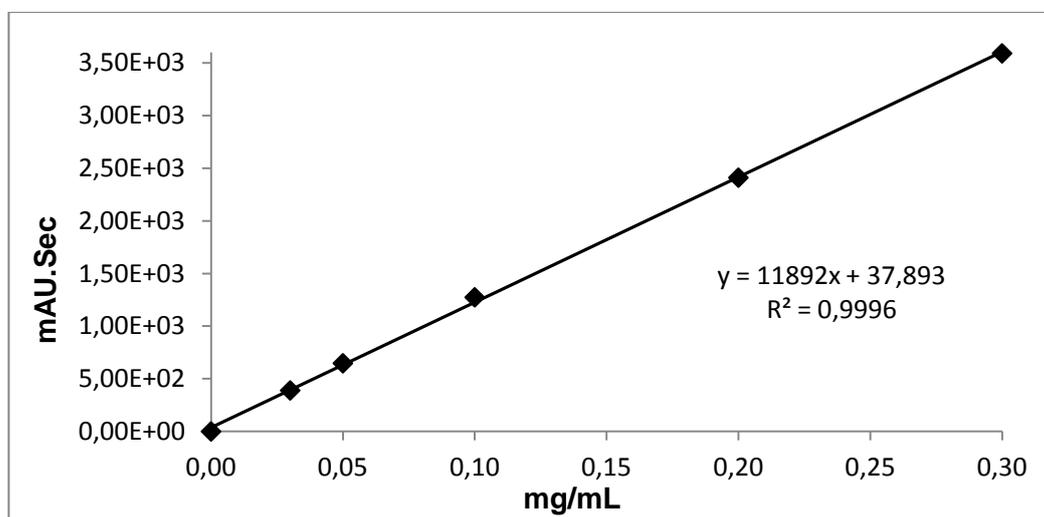
Figura 15. Cromatogramas de los Plaguicidas.

Una vez optimizada la separación cromatográfica y el método de extracción de los compuestos elegidos, se estudian las características analíticas de cada uno de ellos. Se obtuvieron las curvas de calibración para cada compuesto, porcentajes de recuperación, el límite de detección, el límite de cuantificación y el coeficiente de variación. Para establecer las concentraciones de los niveles de calibración se revisaron los Límites máximos residuales (LMR) establecidos por la CICOPLAFEST para cada plaguicida, pero al no establecer un valor específico para el clorpirifos, se seleccionaron los valores, tomando en cuenta

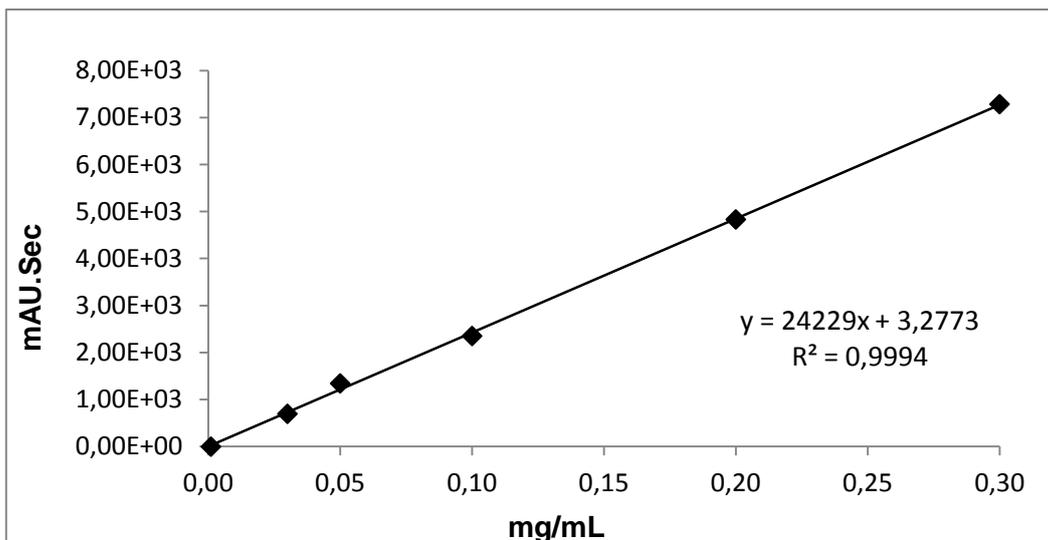
los LMR establecidos por el CODEX/FAO para realizar las curvas de calibración.

**Tabla 18.** Ecuaciones de linealidad de los plaguicidas.

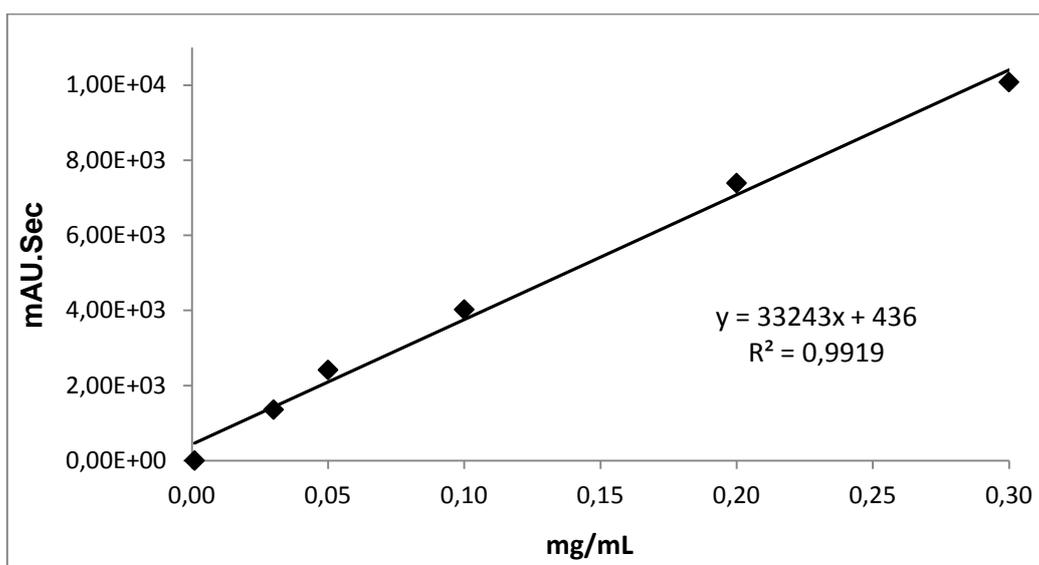
Plaguicida	TR (min)	Intervalo de calibración (mg/mL)	Ecuación de la recta	Linealidad ( $r^2$ )
Malatión	1.86 ± 0.2	0,03 – 0.30	$y = 11892x + 37.893$	0.9996
Diazinón	2.7 ± 0.2	0,03 – 0.30	$y = 24249x + 3.2733$	0.9994
Clorpirifos	3.12 ± 0.3	0,03 – 0.30	$y = 33243x + 436$	0.9919



**Figura 16 a.** Curva de calibración del malatión.



**Figura 16 b.** Curva de calibración del diazinón.



**Figura 16 c.** Curva de calibración del clorpirifos.

En la Tabla 18 se presentan las ecuaciones con las que se modelaron las curvas de calibración a 6 diferentes concentraciones. Los resultados de cuantificación se obtuvieron por medio de los valores obtenidos del área bajo la curva. En las Figuras 16 a, b y c se muestra la linealidad de las respuestas de cada plaguicida en concentraciones dentro del intervalo de la prueba, con coeficientes de correlación lineal ( $r^2$ ) superiores a 0.99.

## 7.4.2 PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN DE LOS ESTÁNDARES

Para conocer este valor, se somete cada uno de los estándares en concentraciones conocidas, al proceso de extracción, siguiendo la metodología aplicada a las muestras. A partir de los datos obtenidos y teniendo en cuenta la concentración inicial del compuesto, se calculan los mg extraídos y el porcentaje de recuperación de cada compuesto (Tabla 19) a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = \frac{\text{mg extraídos}}{\text{mg adicionados}} \times 100$$

**Ecuación 1**

**Tabla 19.** Porcentajes de recuperación de estándares de los plaguicidas.

Plaguicida	Porcentaje de recuperación
Malatión	84 ± 0.7
Diazinón	87 ± 0.6
Clorpirifos	90 ± 0.4

Se obtuvieron valores de recuperación por arriba del 87 ± 3 % lo que indica que tanto el método de extracción propuesto como la como la etapa de limpieza con cartuchos de extracción de fase sólida (SPE), son eficientes. Es posible que las etapas en las cuales se dieron las pérdidas del analito en la pre-concentración una vez realizada la extracción, ya que la fase orgánica en la cual se encuentran disueltos los analitos (acetato de etilo) se filtra a través sulfato de sodio anhidro, proceso en el cual puede es adsorbida una pequeña porción de los compuestos por el sulfato de sodio. Acción que se puede ver repetida al realiza la limpieza de las muestras en las columnas de florisil. Razones por las cuales los porcentajes de recuperación de cada uno de los compuestos en estudio se ven influenciados.

### 7.4.3 COEFICIENTE DE VARIACIÓN, LÍMITES DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Para asegurar la calidad de los resultados de la metodología propuesta, se establecieron algunos criterios de calidad interna, se considero el coeficiente de variación, el límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC), en este trabajo, utilizando los estándares para estas determinaciones. Los valores obtenidos para el LD y LD se presentan en la tabla 20.

**Tabla 20.** Límites de detección, Límites de cuantificación de los plaguicidas.

Plaguicida	Límite de Detección (mg/mL)	Límite de cuantificación (mg/mL)
Malatión	$1.5 \times 10^{-4} - 1.0 \times 10^{-6}$	$1.5 \times 10^{-4} - 1.0 \times 10^{-5}$
Diazinón	$1.0 \times 10^{-4} - 1.0 \times 10^{-6}$	$1.2 \times 10^{-4} - 1.0 \times 10^{-5}$
Clorpirifos	$1.5 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-9}$	$0.5 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-7}$

HPLC marca VARIAN modelo 310, detector UV,  $\lambda = 205$  nm, Flujo: 1 mL/min, Fase móvil ACN:H<sub>2</sub>O (90:10), Vol. Inyección: 20  $\mu$ L, Presión: 797 PSI. Columna Agilent Technologies Tipo ZORBAX Eclipse XDB-C18 4.6 X 150 mm, 5  $\mu$ m

Como ya se dijo, todos estos estudios se realizan por triplicado, así los valores que aparecen en las tablas de los rendimientos es el promedio de los resultados obtenidos en cada ensayo.

Como se sabe la GC es la técnica más empleada para el análisis multiresidual de plaguicidas, debido a la sensibilidad que presenta, capaz de conseguir LD en el rango de lo  $\mu$ g/L o incluso en algunos casos de ng/L. En este caso como se puede observar en la Tabla 20 los valores obtenidos tanto para el LD como para el LC, se encuentran cercanos a los rangos reportados en estudios en donde se emplea la GC como técnica instrumental.<sup>[6, 36, 37, 64]</sup> Por lo que la HPLC se podía proponer como una metodología alternativa en la determinación plaguicidas organofosforados

Para evaluar la precisión de la técnica se obtuvieron los coeficientes de variación de cada uno de los estándares, realizando cinco inyecciones (n=5) consecutivas a una concentración conocida (0.1 mg/mL). En la Tabla 21 se presentan los valores de reproducibilidad, empleando la ecuación 2 para calcular estos valores.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

**Ecuación 2**

$$\text{Coeficiente de Variación} = (S/\bar{x}) \times 100$$

Donde:

**S:** desviación estándar

**x:** valor de la réplica

$\bar{x}$ : promedio

**n:** número total de réplicas

**Tabla 21.** Reproducibilidad de estándares de los plaguicidas.

<b>Plaguicida</b>	<b>Coeficiente de variación (%)</b>
Malatión	1.80
Diazinón	1.65
Clorpirifos	1.02

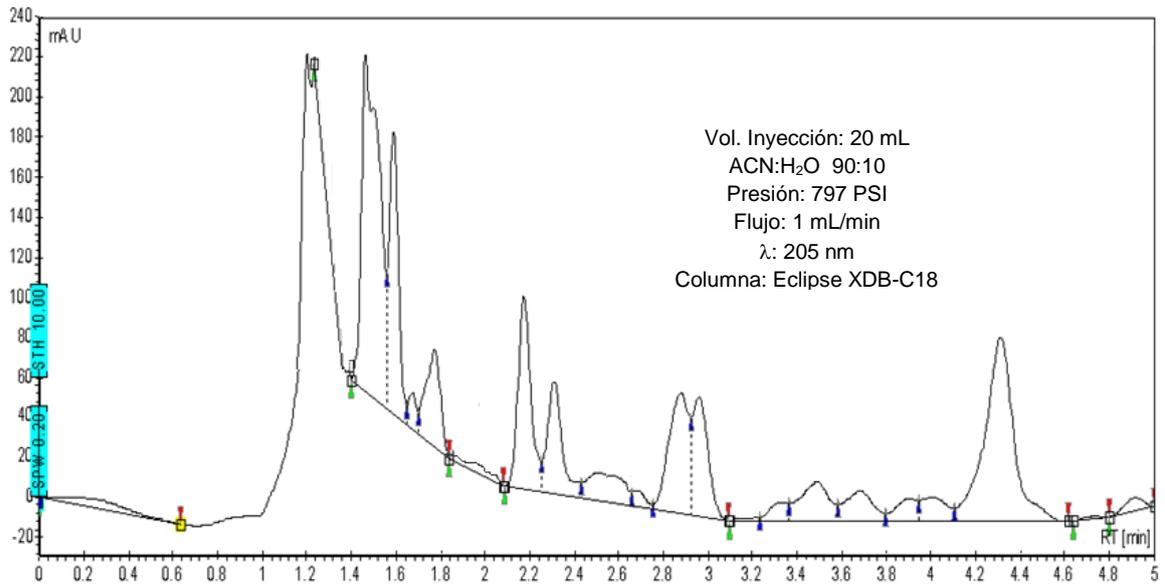
Los coeficientes de variación de las áreas de cada uno de los compuestos presentan valores menores al 2 % lo que indica que los valores obtenidos para este estudio son reproducibles, por lo que la metodología empleada es estadísticamente confiable.

## **7.5 ANÁLISIS DE PESTICIDAS EN MANZANA**

Tal como se ha indicado anteriormente, la determinación de residuos de plaguicidas en muestras reales plantea serias dificultades como la baja concentración de los mismos en este tipo de muestras, así como la gran cantidad de interferencias de la propia matriz de la muestra. Con objeto de aplicar la metodología propuesta se realizó el análisis de plaguicidas en muestras reales. La muestra en la cual se desarrolla el estudio corresponde a manzana Red Delicious, la cual presenta una humedad de 83.6 %, 2% de fibra y un contenido de azúcares del 13 %. Al comienzo del estudio se analizaron manzanas obtenidas en diferentes sitios buscando residuos de plaguicidas en estudio. Después de analizar un gran número de muestras y sin tener resultados de utilidad, se optó por contaminar las manzanas con una mezcla de los plaguicidas estudiados, buscando conocer la eficiencia del método en una matriz alimentaria.

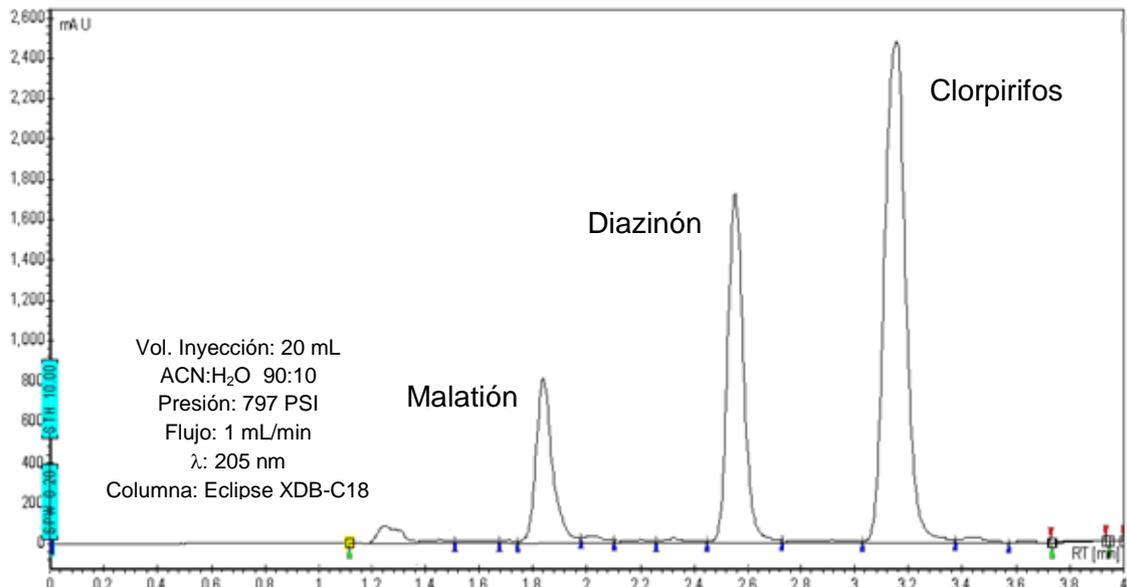
### **7.5.1 PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN**

La determinación se realizó utilizando una manzana con un peso aproximado de  $183.84 \pm 10.55$  g, de esta la mitad se contaminó con la mezcla de plaguicidas (M1) y se tomó una alícuota de  $5.0 \pm 0.1$  g para realizar el análisis, la otra mitad se dejó como muestra blanco (M2) tomándose también  $5.0 \pm 0.2$  g para el análisis y se obtuvieron los cromatogramas de ambas muestras para hacer una comparación de estos.



**Figura 17.** Cromatogramas de la manzana blanco.

La Figura 17 pertenece a la muestra blanco, en el se puede apreciar picos pertenecientes a materia orgánica que no pudo ser eliminada en el clean-up. Como podemos observar, ninguno de los picos correspondientes a los plaguicidas analizados.



**Figura 18.** Cromatogramas de la manzana contaminada.

La Figura 18 muestra el cromatograma obtenido del extracto de manzana contaminada. Los picos presentan una buena resolución, se puede observar que las impurezas de la muestra siguen apareciendo, aunque son casi imperceptibles. Una vez obtenidos los cromatogramas de las muestras analizadas se calcula la concentración de cada pico con ayuda de las ecuaciones obtenidas de las curvas patrón (tabla 17), para así poder conocer el porcentaje de recuperación de cada compuesto.

Para poder calcular los porcentajes de recuperación es necesario saber la concentración de plaguicidas en los 5.0 g de muestra con los cuales se realizó el estudio. Para eso se utilizó la ecuación 4:

$$\text{Concentración inicial del plaguicida} = \frac{\text{mg de plaguicida}}{\text{g de muestra}} \times \text{g de alicuota}$$

**Ecuación 4**

Tomando en cuenta que los gramos de muestra utilizada fueron 83.905 g de manzana (base húmeda) y que la alicuota tomada fue de 5.306 g de manzana contaminada se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 22).

**Tabla 22.** Porcentaje de recuperación de los plaguicidas en manzana (base húmeda).

Plaguicida	mg de plaguicida	Concentración inicial (mg/mL)	Concentración final (mg/mL)	Porcentaje de Recuperación
Malatión	6.0	0.38	0.30	78 ± 1.7
Diazinón	6.0	0.38	0.29	75 ± 1.2
Clorpirifos	6.0	0.38	0.36	96 ± 1.3

Como se puede observar el clorpirifos presenta un porcentaje de recuperación mayor al 90 %, se podría decir que se debe a que el plaguicida no fue absorbido completamente por la muestra, por lo cual al encontrarse una mayor cantidad en la superficie, facilitó su extracción de la muestra. En el caso del Diazinón y el Malatión los porcentajes de recuperación están por arriba del 70 % lo que nos indica que el método empleado de extracción sólido-líquido (extracción con acetato de etilo durante 5.0 h) es eficiente ya que en base a estos resultados se puede afirmar que los plaguicidas tiene una buena afinidad por el disolvente utilizado. De igual forma, la técnica de limpieza empleada (extracción en fase sólida), da buenos resultados al eliminar la mayor parte de la materia orgánica presente en la muestra y retener pocas cantidades de analito.

## VIII. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente Tesis, se pueden concluir que se logró optimizar una serie de metodologías analíticas para la determinación de plaguicidas organofosforados en muestras de manzana, las cuales combinan el uso de cromatografía de líquidos y métodos de extracción (sólido-líquido y extracción en fase sólida (SPE) con florisil). Dando como resultado, alcanzar límites de detección del orden de 0.01 mg/L (ppm) para el caso del Diazinón y el Malatión y de 0.1 µg/L (ppb) para el colpirifos. Así también se demostró la utilidad de los métodos de extracción optimizados en la determinación de plaguicidas organofosforados en muestras reales, obteniendo porcentajes de recuperación mayores al 70%.

Así también se logró caracterizar a cada uno de los plaguicidas en base a sus propiedades fisicoquímicas, lo cual permitió entender el comportamiento que presentan los compuestos estudiados tanto en el análisis como en la interacción con el medio ambiente.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Bernal, M., et al., *Plaguicidas en México: Algunos métodos para determinar residuos de plaguicidas en agua y matrices biológicas*, México Facultad de Química, 2006: p. 1-4, 9-11, 17, 21, 23.
2. FAO, Comision Del Codex Alimentarius Manual De Procedimiento. 2005: FAO Inter-Departmental Working Group.
3. INEGI. Encuesta Mensual de la Industria Manufacturera EMIM., Revisado 2013;  
Available from: <http://www.inegi.org.mx/sistemas/bie/default.aspx>.
4. Ahmed, F.E., *Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2001. 20(11): p. 649-661.
5. Barr, D.B. and L.L. Needham, *Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2002. 778(1-2): p. 5-29.
6. Berrada, H., G. Font, and M. J.C., *Application of solid-phase microextraction for determining phenylurea herbicides and their homologous anilines from vegetables*. Journal of Chromatography A, 2003. 1042(1-2): p. 9-14.
7. Dušek, B., J. Hajšlová, and V.r. Kocourek, *Determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons and their precursors in biotic matrices*. Journal of Chromatography A, 2002. 982(1): p. 127-143.
8. *Programa Conjunto FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS*. Codex Alimentarius, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Organización Mundial de la Salud, Roma Italia, 1996: p. 473.
9. Andersson, A. and H. Palsheden, *Comparison of the efficiency of different GLC multi-residue methods on crops containing pesticide-residues*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 1991. 339(6): p. 365-367.

10. Sawyer, L., et al., *Pesticide and industrial chemical residues. Official Methods of Analysis, AOAC, Agricultural Chemicals. Contaminants and Drugs*. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, USA, 1990: p. 274-290.
11. Tekel, J. and S. Hatrik, *Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods: Clean-up procedures and selective detectors*. Journal of Chromatography A, 1996. 754(1-2): p. 397-410.
12. Torres, C.M., Y. Pico, and J. Manes, *Determination of pesticide residues in fruit and vegetables*. Journal of Chromatography A, 1996. 754(1-2): p. 301-331.
13. FAO. Principales alimentos agrícolas producidos en el mundo. Estadísticas 2012. Producción de manzana Revisado 2013; Available from: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
14. LG, C., G. CL, and M. SD, *Toxicology of pesticides experimental, clinical and regulatory perspectives*. 1ª ed. Cell Biology, ed. N. ASI. Vol. 13. 1987, Italy: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo. 320.
15. Shepard, H.H., *The Chemistry and Toxicology of Insecticides*. 1939, Minneapolis: MN:Burgess Publishing Company. 125-173.
16. CICOPLAFEST. México. Comisión Intersecretarial para el Control y uso de Plagas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas, Catálogo oficial de plaguicidas; Secretaría de Salud, 2004: p. 56, 67,133.
17. Yúfera, E.P. and J.M.C. Dorrién, *Química agrícola.*, ed. Alhambra., Univesidad de Buenos Aires Argentina, 1986: p. 48.
18. Singh, D.K., *Pesticide Chemistry and Toxicology*, ed. Bentham Science Publishers, University of Delhi India, 2012: p. 32-42.
19. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and Guidelines to classification 2004, World Health Organization and International program of chemical on Chemical safety, 2005.
20. Capri, E. and D. Karpouzas, *Pesticide Risk Assessment in Rice Paddies: Theory and Practice*, ed.Elsevier Science, Oxford UK, 2011: p. 63, 70-72.

21. Jansson, C., et al., *A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection*. Journal of Chromatography A, 2004. 1023(1): p. 93-104.
22. Chambers, J.E. and Levi, P.E., *Organofosforados: química, vías y efectos*, Academic Press San Diego, 1992: p. 443.
23. Díaz, G., *Determinación de hidrocarburos organoclorados en sedimentos y organismos de la plataforma continental y zonas costeras del Golfo de México.*, Tesis Doctoral. Doctorado en Ciencias del Mar (Oceanografía Química). UACPyP-CCH. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. México. UNAM, 1992
24. Quinto, J.O., NTP 512: *Plaguicidas organofosforados (I): aspectos generales y toxicocinética.*, Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales de España, 2009: p. 7.
25. Jiménez, B.E., *La Contaminación Ambiental en México.*, Colegio de Ingenieros Ambientales de México, 2001.
26. Barberá, C., *Pesticidas agrícolas*. Ed. Omega, S.A., 4ª Edición, Barcelona España, 1989: p. 109 - 118.
27. Alpuche, L., Albert L.A., *Los Plaguicidas y sus efectos en el ambiente y la salud*. México: Centro de Ecodesarrollo, 1990: p. 139 – 145.
28. Programme, U.N.E. and W.H. Organization, *Strategic approach to international chemicals management: comprising the Dubai declaration on international chemicals management, the overarching policy strategy and the global plan action : resolution of the international conference on chemicals management*. 2006: United Nations Environment Programme. *Sobre el Medio, D.d.E. Humano*. in Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Humano. Estocolmo. 1972.
29. Kummer, K., *Prior Informed Consent for Chemicals in International Trade: The 1998 Rotterdam Convention*. Review of European Community & International Environmental Law, 1999. 8(3): p. 323-329.
30. INE-SEMARNAP, R., *Registro de Emisiones y Transferencia de Contaminantes*. INE-SEMARNAP, México, 1997.

31. Bejarano, F. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México RAPAM, Amenaza global. 2000.
32. Patnaik, P., *Dean's Analytical Chemistry Handbook*. 2ª Edición, Edit. Mcgraw-hill. New York U.S., 2004: p. 174.
33. Andreu, V., Pico Y., *Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2004. 23(10-11): p. 772-789.
34. Huayamave C.S., *Determinacion y evaluacion de plaguicidas residuales en banano ecuatoriano de consumo en la Ciudad de Guayaquil en el Marco De Seguridad Alimentaria*. 2009.
35. Lesueur, C., et al., *Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method*. Food Control, 2008. 19(9): p. 906-914.
36. Wilkowska, A. Biziuk, M., *Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology*. Food Chemistry, 2011. 125(3): p. 803-812.
37. Garrido-Frenich, A., et al., *Monitoring multi-class pesticide residues in fresh fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2004. 1048(2): p. 199-206.
38. Ahmad, N., et al., *Determination of organochlorine and organophosphate pesticide residues in fruits, vegetables and sediments*. Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes, 2009. 34(5): p. 829 - 848.
39. Fritz, J.S., *Analytical solid-phase extraction*, Wiley-Vch, New York U.S., 2009: p. 73 – 79.
40. Dean, J.R., *Extraction methods for environmental analysis*. John Wiley & Song, Chichester U.K., 2008: p. 174 – 181.
41. Hincapié, M.M., Zapata, N.M., *Análisis en leche de pesticidas organofosforados y piretroides por cromatografía gaseosa*. Vitae, 2009. 6(2): p. 11 – 19.

42. Wylie, P., et al., Comprehensive Screening, Confirmation, and Quantification of Organic Pesticides in Foods by GC–MS and LC–MS. 2008.
43. Doemoeterova, M., Matisova, E., *Fast gas chromatography for pesticide residues analysis*. Journal of Chromatography A, 2008. 1207(1-2): p. 1-16.
44. Barahona, C.M., Sancho, B.E. , *Manzana, melocotón, fresa y mora. Fruticultura Especial 6*. 1ª ed., EUNED, San José Costa Rica, 1998: p. 19 – 37.
45. Sozzi, G.O., *Árboles frutales Ecofisiología, cultivo y aprovechamiento*, Facultad de Agronomía, Buenos Aires, 2008: p. 27 – 32.
46. Westwood, N.H., *Fruticultura de zonas templadas*. 1ª ed., Mundi-Persa, Madrid España, 1982: p. 456 – 461.
47. Gebhardt, S., Thomas, R., *Nutritive Value of Foods*, United States Department of Agriculture, Editor. Nutrient Data Laboratory, Beltsville, Maryland, USA, 2002 (64).
48. ASERCA., *Manzana*, Revista mensual Claridades Agropecuarias, Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria, México, Abril 2011: p. 40.
49. INFOAGRO, *Curso de Fruticultura; Manzana*, España, Revisado 2013: p. 197.
50. SAGARPA-SIAP. *Resumen Nacional de la Producción Agrícola. Tabla: Avances de Siembras y Cosechas.*, Revisado 2013 Available from: <http://www.siap.gob.mx>.
51. SAGARPA. *Proyecto manejo integral de plagas en manzano en el estado de Chihuahua 2009.*, Revisado 2013; Available from: <http://www.sicde.gob.mx>.
52. Islam, S., et al., *Analyses of some pesticide residues in cauliflower by High Performance Liquid Chromatography*. American Journal of Environmental Sciences, 2009. 5(3): p. 325-329.

53. Tarola, A.M., Di Folco, F., Giannetti, V., *Determination of Pesticide Residues in Cereals by Liquid Chromatography and UV Detection*. Analytical Letters, 2008. 41(16): p. 2985-2995.
54. Islam, S., et al., *Application of High Performance Liquid Chromatography to the analysis of pesticide residues in eggplants*. Journal of Applied Sciences, 2009. 9(3): p. 973-977.
55. De Llasera, M.P.G., Cruz-Reyes, L., Vera-Avila, L.E., *A method for the analysis of organophosphorus pesticide residues in Mexican axolotl*. Journal of Environmental Science and Health Part B, 2009. 45(1): p. 25-32.
56. Garcés, M.M., Dallos, J.A.G., *Validación de una metodología multiresiduo para la determinación de residuos de plaguicidas en fresa (Fragaria spp.) por cromatografía de gases*. REVISTA COLOMBIANA DE QUÍMICA, 2001. 30(1).
57. Harris, D.C., *Análisis químico cuantitativo*. 3ª Edición, Edit. Reverté, Barcelona España, 2007: p. 113-116.
58. 5.11.5, M., *Programa de Computadora para modelado de moléculas*. Marvin Sketch 5.11.5. 2013.
59. Shriver, D.F., P.W. Atkins, and C.H. Langford, *Química Inorgánica*. Reverté, 1998: 125 - 134.
60. Gispert, J.C., *Estructura atómica y enlace químico*. Reverté, 1996:.
61. Gaussian, *Programa de Computadora para modelado de moléculas*, Gaussian 09. Método B3LYP Set de Bares 6-311g.
62. Swadesh, J.K., *HPLC: Practical and Industrial Applications*, Second Edition. 2000: Taylor & Francis.
63. Chai, M.K. and G.H. Tan, *Validation of a headspace solid-phase microextraction procedure with gas chromatography-electron capture detection of pesticide residues in fruits and vegetables*. Food Chemistry, 2009. 117(3): p. 561-567.