

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



**“EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN FRESAS EMPLEANDO LA CROMATOGRFÍA DE GASES CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS”**

Trabajo Especial de Grado presentado ante  
la ilustre Universidad Central de Venezuela  
por el Br. Rafael Pérez, para optar al título  
de Licenciado en Química

Caracas, Mayo 2013

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del trabajo Especial de Grado titulado: **“EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN FRESAS EMPLEANDO LA CROMATOGRAFÍA DE GASES CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS”**. Presentado por el Br. Rafael Guillermo Pérez Rincón, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

---

Profa. Rosa Amaro (Tutor)

---

Msc. Janeth Salas (Tutor)

---

Profa. Raiza Fernandez (Jurado)

---

Prof. Gustavo Pérez (Jurado)

Yo, Profesora Rosa Amaro investigadora del Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y yo la Msc. Janeth Salas Investigadora del Centro de Química del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

**“EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN FRESAS EMPLEANDO LA CROMATOGRAFÍA DE GASES CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS”**

Que presenta el Br. Rafael Guillermo Pérez Rincón para aspirar al título de Licenciado de Química ha sido realizado en el Laboratorio de Química del Centro de Química del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas bajo nuestra dirección durante el año 2012 y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Mayo 2013

---

Dra. Rosa Amaro (Tutor)

---

Msc. Janeth Salas (Tutor)

Este trabajo va dedicado a mi familia  
en especial a Matías David por traerme  
alegría y darme impulso para culminar  
este camino.

## RESUMEN

Los pesticidas son compuestos tóxicos y peligrosos que se emplean en los cultivos de alimentos para combatir diversas plagas, algunos de estos compuestos son altamente persistentes en los medios donde son aplicados, es por esto que la determinación de pesticidas en diversas matrices de alimentos es un análisis cada día más rutinario en los laboratorios que trabajan con alimentos. Es conocido que el paso crítico en un estudio analítico es el tratamiento de la muestra pues involucra una mayor manipulación de la misma teniendo en cuenta que debe asegurarse la obtención total de los analitos estudiados. En el presente estudio se evaluaron los métodos de extracción QuEChERS y extracción asistida por microondas (MAE) para la determinación de los pesticidas organoclorados Aldrín y Heptacloro y los organofosforados Malatión y Metilparatión en muestras de fresas.

Se determinó el método de cuantificación idóneo para cuantificar tanto para MAE como para QuEChERS, evaluando los métodos curva de estándar interno y curva de calibración externa, se encontró que la curva de calibración externa generó resultados más cercanos al valor real en comparación con estándar interno para ambos métodos de extracción.

Se evaluaron parámetros analíticos de calidad a nivel instrumental, se obtuvo un buen ajuste lineal con valores de  $R^2 > 0,9986$  para las curvas de calibración de todos los pesticidas estudiados. Los límites de detección variaron entre 0,95 a 1,47mg/Kg y los límites de cuantificación variaron entre 1,56 y 4,90 mg/Kg a un nivel de confianza de 95%.

Para la extracción asistida por microondas se evaluaron los parámetros experimentales que afectan la recuperación a través de un estudio estadístico de diseño de experimento por análisis factorial. Los resultados demuestran la necesidad de optimización de forma individual para cada pesticida evaluado encontrándose degradación de los pesticidas organofosforados a las condiciones más fuertes de

extracción en términos de tiempo y de temperatura. Las condiciones optimas de extracción para todos los pesticidas evaluados fueron a un tiempo de extracción de 5 minutos, a una temperatura de extracción de 60°C y una concentración añadida de pesticida de 50mg/Kg. Bajo estas condiciones se obtuvo valores de coeficientes de variación  $CV < 5\%$  y valores de recuperación superiores a 90% para todos los pesticidas estudiados.

En el método QuEChERS al ser un protocolo establecido no requirió un proceso de optimización, se evaluó la precisión y exactitud a concentraciones añadidas de pesticida de 10 y 20mg/Kg obteniendo que el método es preciso dando unos valores de coeficientes de variación entre 1-6% y 3-4% respectivamente y que el método es exacto obteniendo porcentajes de recuperación entre 86-95% y 86-94% respectivamente.

Se evaluó una muestra representativa de fresas que fue expuesta a la aplicación de diversos pesticidas, a la misma se le aplicó la condición optima de extracción asistida por microondas y el método QuEChERS, con la extracciones realizadas se observó la ausencia de los pesticidas estudiados en la muestra. También se detectó la presencia de sustancias propias del fruto como ácidos grasos de cadena larga y compuestos antioxidantes, así como un compuesto perteneciente la familia de los triazoles que se emplea en la agricultura debido a sus propiedades fungicidas.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, hermanos y abuela, mi familia quienes me han apoyado y ayudado a lo largo de toda mi vida, sin su ayuda mi carrera no hubiese sido posible.

A la Universidad Central de Venezuela la casa que vence la sombra por ser el pilar de mi formación como profesional y como ciudadano.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas por complementar mi formación profesional y por el apoyo en la realización experimental de este trabajo.

A mis tutoras Janeth Salas y Rosa Amaro por la dedicación, el tiempo, paciencia, regaños, consejos y su invaluable apoyo en la culminación exitosa de este trabajo.

A la Dra Zully Benzo por darme la oportunidad de ingresar como estudiante en entrenamiento al laboratorio de química analítica del IVIC.

A la Dra Tamara Zoltan y al Lic Carmel Inojosa del laboratorio de Fotoquímica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas por su apoyo desinteresado en la culminación de este proyecto.

Al Grupo de preparadores con que compartí como preparador en el laboratorio de Análisis Instrumental, y al profesor Rafael Golding de quien aprendí valiosas lecciones a nivel profesional.

A todos mis amigos del cuerpo de guías Aula Magna-Sala de Conciertos, las mejores lecciones de vida las aprendí junto a ustedes, guía hoy guía siempre.

A Luis Aguilar, amigo nerdo, por todos los momentos divertidos que compartimos y que compartiremos.

A Gabriela González, compañera de vida, risas, ilusiones, peleas, tristezas y mucha felicidad, mil líneas no son suficientes para agradecerte tantas cosas.

## ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. JUSTIFICACIÓN .....	3
3. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA .....	5
3.1 Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPS) .....	5
3.2 Pesticidas .....	5
3.3 Residuo de pesticida .....	6
3.4 Clasificación de los pesticidas .....	6
3.4.1 Según su actividad .....	6
3.4.2 Según su regulación .....	8
3.4.3 Según su composición química .....	9
3.4.4 Según el ámbito de aplicación .....	12
3.4.5 Según su toxicidad y/o peligrosidad .....	12
3.5 Propiedades y características de los pesticidas organoclorados y organofosforados .....	14
3.5.1 Pesticidas organoclorados.....	14
3.5.2 Pesticidas organofosforados .....	16
3.5.3 Pesticidas organoclorados versus pesticidas organofosforados .....	17

3.6 Aplicación de pesticidas y su influencia en la persistencia y proliferación de residuos permanentes .....	19
3.7 Métodos de análisis para la determinación de residuos de pesticidas en frutos y vegetales .....	20
3.7.1 Métodos de extracción .....	21
3.7.1.1 Métodos clásicos.....	21
3.7.1.2 Métodos modernos .....	23
3.7.1.3 Comparación de los métodos de extracción de residuos de pesticidas.....	28
3.7.2 Métodos de análisis.....	30
3.7.2.1 Cromatografía de gases espectrometría de masas (GC-MS).....	31
3.8 Área de muestreo .....	32
3.8.1 Información General .....	32
3.8.2 Ubicación .....	32
3.8.3 Geografía.....	33
3.8.4 Hidrología y meteorología .....	34
3.8.5 Economía .....	34
3.8.6 Empleo de pesticidas en la región .....	35
3.9. Muestreo por codex alimentarius .....	36
3.10 Pesticidas a estudiar .....	37

3.10.1 Metilparati6n .....	37
3.10.2 Heptacloro .....	40
3.10.3 Malati6n .....	42
3.10.4 Aldr6n .....	45
3.11 Herramientas estad6sticas para la comparaci6n de resultados .....	48
3.11.1 Dise1o de experimento por an6lisis factorial .....	49
3.12 L6mites m6ximos residuales .....	49
3.13 Legislaci6n y normativa relacionada con el empleo de pesticidas en la Rep6blica Bolivariana de Venezuela .....	50
3.13.1 Legislaci6n internacional .....	51
3.13.2 Legislaci6n nacional .....	52
4. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACI6N .....	55
4.1 Antecedentes Internacionales .....	55
4.2 Antecedentes Nacionales .....	57
5. OBJETIVOS .....	60
5.1 Objetivo general .....	60
5.2 Objetivos espec6ficos .....	60
6. METODOLOG6A EXPERIMENTAL .....	61
6.1 Instrumentaci6n y accesorios .....	61
6.1.1 Instrumentaci6n .....	61

6.1.2 Accesorios .....	63
6.2 Reactivos .....	64
6.3 Tratamiento de la muestra .....	64
6.3.1 Muestreo según normativa codex alimentarius .....	65
6.3.2 homogenización y almacenamiento .....	66
6.4 Preparación de patrones y curvas de calibración .....	66
6.5 Métodos de extracción .....	66
6.5.1 Método de extracción asistida por microondas MAE .....	67
6.5.1.1 Condiciones optimas de extracción MAE .....	67
6.5.2 Método de extracción QuEChERS .....	69
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	71
7.1 Determinación del método de cuantificación .....	72
7.1.1 Extracción asistida por microondas .....	72
7.1.2 Extracción QuEChERS .....	76
7.2 Parámetros de calidad analítica instrumental .....	78
7.3 Evaluación de las condiciones optimas para la extracción asistida por microondas según diseño de experimento .....	79
7.3.1 Análisis del diseño factorial para la recuperación de Metilparatió .....	81
7.3.2 Análisis del diseño factorial para la recuperación de Heptacloro .....	85
7.3.3 Análisis del diseño factorial para la recuperación de Malatió .....	87

7.3.4	Análisis del diseño factorial para la recuperación de Aldrín .....	90
7.3.5	Parámetros analíticos de calidad para la extracción asistida por microondas.....	96
7.4	Evaluación estadística del método de extracción QuEChERS .....	98
7.4.1	Parámetros analíticos de calidad para la extracción QuEChERS .....	98
7.5	Comparación entre el método de extracción asistida por microondas y el método de extracción QuEChERS .....	101
7.6	Análisis de la muestra obtenida según normativa codex alimentarius .....	102
8.	CONCLUSIONES.....	110
9.	RECOMENDACIONES .....	111
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	112
11.	APENDICE .....	121

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Clasificación de pesticidas según su actividad .....	7
<b>Tabla 2:</b> Clasificación de pesticidas según su toxicidad y peligrosidad según la Comisión Venezolana de Normas Industriales.....	13
<b>Tabla 3:</b> Tabla comparativa entre los pesticidas organoclorados y organofosforados .....	18
<b>Tabla 4:</b> Tabla comparativa de ventajas y desventajas de algunos métodos de extracción.....	28
<b>Tabla 5:</b> características, propiedades físicas y químicas del Metilparatión.....	38
<b>Tabla 6:</b> características, propiedades físicas y químicas del Heptacloro.....	40
<b>Tabla 7:</b> características, propiedades físicas y químicas del Malatión.....	43
<b>Tabla 8:</b> características, propiedades físicas y químicas del Aldrín.....	46
<b>Tabla 9:</b> Límites Máximos Residuales para los compuestos estudiados en fresas...50	
<b>Tabla 10:</b> Resumen de las investigaciones expuestas en los antecedentes a la investigación.....	59
<b>Tabla 11:</b> Programa térmico del horno cromatográfico para la separación de los pesticidas .....	62
<b>Tabla 12:</b> Condiciones y características del muestreo realizado por la normativa <i>codex alimentarius</i> .. ..	65
<b>Tabla 13</b> Factores y niveles del diseño de experimento utilizado .....	67

<b>Tabla 14:</b> Diseño experimental empleado para optimizar las condiciones experimentales en el equipo de radiación microondas.....	68
<b>Tabla 15:</b> Tiempos de retención promedio para los pesticidas estudiados.....	72
<b>Tabla 16:</b> Determinación en mg/Kg de los distintos pesticidas agregados, por el método de estándar interno.....	73
<b>Tabla 17:</b> Determinación en mg/Kg de los distintos pesticidas agregados, por el método de calibración externa .....	73
<b>Tabla 18:</b> Prueba F de Fisher para comparar las varianzas de los métodos de cuantificación calibración externa y estándar interno con la extracción asistida por microondas.....	74
<b>Tabla 19:</b> Prueba t de Student para comparar las medias de los métodos de cuantificación por calibración externa y estándar interno con la extracción asistida por microondas.....	75
<b>Tabla 20:</b> Determinación en mg/Kg de los distintos pesticidas agregados, por los métodos de cuantificación evaluados para el método QuEChERS .....	76
<b>Tabla 21:</b> Prueba F de Fisher para comparar las varianzas de los métodos de cuantificación por calibración externa y estándar interno con el método de extracción QuEChERS .....	76
<b>Tabla 22:</b> Prueba t de Student para comparar las medias de los métodos de cuantificación por calibración externa y estándar interno con el método de extracción QuEChERS .....	77
<b>Tabla 23:</b> Parámetros de calidad analítica instrumental .....	79

<b>Tabla 24:</b> Porcentajes de recuperación obtenidos con el diseño de experimento 2 <sup>3</sup> para cada pesticida estudiado en la optimización del método de extracción asistida por microondas.....	80
<b>Tabla 25:</b> Condiciones experimentales óptimas para cada pesticida en la extracción asistida por microondas.....	93
<b>Tabla 26:</b> Parámetros de precisión para la condición óptima del método extracción asistida por microondas.....	96
<b>Tabla 27:</b> Parámetros de exactitud para la condición óptima del método extracción asistida por microondas.....	97
<b>Tabla 28:</b> Valores de recuperación del método de extracción QuEChERS para cada concentración de pesticida añadido....	98
<b>Tabla 29:</b> Parámetros de precisión para el método de extracción QuEChERS a una concentración añadida de pesticida de 10mg/Kg .....	99
<b>Tabla 30:</b> Parámetros de exactitud para el método de extracción QuEChERS a una concentración añadida de pesticida de 10mg/Kg .....	99
<b>Tabla 31:</b> Parámetros de precisión para el método de extracción QuEChERS a una concentración añadida de pesticida de 20mg/Kg .....	100
<b>Tabla 32:</b> Parámetros de exactitud para el método de extracción QuEChERS a una concentración añadida de pesticida de 20mg/Kg .....	100

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estructura química de algunos pesticidas organoclorados .....	10
<b>Figura 2:</b> Estructura química de algunos pesticidas organofosforados .....	11
<b>Figura 3:</b> Ubicación y límites del Municipio Tovar del estado Aragua .....	33
<b>Figura 4:</b> Diagrama de cómo se debe realizar el muestreo en función de la uniformidad del lote muestreado .....	36
<b>Figura 5:</b> Estructura química del Metilparatión .....	38
<b>Figura 6:</b> Estructura química del Heptacloro .....	41
<b>Figura 7:</b> Estructura química del Malatión .....	43
<b>Figura 8:</b> Estructura química del Aldrín .....	46
<b>Figura 9:</b> Programa térmico del horno cromatográfico para la separación de los pesticidas .....	62
<b>Figura 10:</b> Esquema del Proceso de extracción asistida por microondas. ....	69
<b>Figura 11:</b> Esquema del proceso de extracción QuEChERS. ....	70
<b>Figura 12:</b> Orden de elución y tiempos de retención de los pesticidas estudiados. .	71
<b>Figura 13:</b> Diagrama de Pareto para la recuperación de Metilparatión. ....	81
<b>Figura 14:</b> diagramas de interacción para el pesticida Metilparatión.....	82
<b>Figura 15:</b> Gráfico de efectos principales para la recuperación de Metilparatión. ....	84
<b>Figura 16:</b> Diagrama de Pareto para la recuperación de Heptacloro. ....	85
<b>Figura 17:</b> Gráfico de efectos principales para la recuperación de Heptacloro. ....	86

<b>Figura 18:</b> Diagrama de Pareto para la recuperación de Malatión .....	87
<b>Figura 19:</b> diagrama de interacción temperatura- concentración para el pesticida Malatión.....	88
<b>Figura 20:</b> Gráfico de efectos principales para la recuperación de Malatión .....	89
<b>Figura 21:</b> Diagrama de Pareto para la recuperación de Aldrín .....	90
<b>Figura 22:</b> Diagrama de interacción tiempo-temperatura para el pesticida Aldrín ....	91
<b>Figura 23:</b> Grafico de efectos principales para la recuperación de Aldrín .....	92
<b>Figura 24:</b> Cromatograma de la condición optima para la extracción asistida por microondas.....	94
<b>Figura 25:</b> Cromatograma de una condición menos favorable para la extracción asistida por microondas.....	95
<b>Figura 26:</b> Cromatograma del método de extracción QuEChERS a una concentración añadida de pesticida de 20mg/Kg .....	101
<b>Figura 27:</b> Espectros de masa de los pesticidas Metilparatión y Malatión.....	103
<b>Figura 28:</b> Espectros de masa de los pesticidas Heptacloro y Aldrín.....	104
<b>Figura 29:</b> Extracción asistida por microondas para la muestra representativa obtenida a través de la normativa codex alimentarius.....	105
<b>Figura 30:</b> Extracción QuEChERS para la muestra obtenida a través del codex alimentarius.....	106
<b>Figura 31:</b> Espectro de masas y datos del indol-3-acetaldehido. ....	108
<b>Figura 32:</b> Espectro de masas del fungicida tipo triazol encontrado en la muestras.	109



---

---

## 1) INTRODUCCION

Los pesticidas o plaguicidas se han usado a lo largo de los años como agentes principales en el control de vectores de parásitos, insectos y enfermedades que afectan los sembradíos de alimentos. Debido a que la mayoría de los pesticidas son compuestos químicos altamente contaminantes se les clasifica en la categoría de Compuestos Orgánicos Persistentes (COPS), por tanto su uso inadecuado trae consecuencias negativas sobre la salud y el ambiente.

En 1953 la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoció por primera vez que el incremento en el uso de agroquímicos en la industria de alimentos ha creado un problema de salud pública [1], debido a esto la Organización Mundial de la Salud junto con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés) tomaron medidas para: disminuir el uso de plaguicidas en los cultivos, limitar la presencia de los mismos en los alimentos y desarrollar pesticidas con un menor impacto ambiental y sobre la salud.

En Venezuela la regulación de pesticidas adquiere importancia debido a la alta actividad agrícola ejercida en zonas rurales del país [2], por lo que se ha estudiado cuales de esas zonas ejerce una gran actividad de aplicación de pesticidas y se han evaluado las consecuencias ambientales, sociales y de salud que esto acarrea [3]. Se sospecha que ciertas enfermedades están directamente relacionadas con la presencia de pesticidas en altas concentraciones en zonas campesinas, ya que sus pobladores presentan frecuentemente problemas congénitos, enfermedades mentales y hasta depresión lo que conlleva a un alto porcentaje de suicidios, sin embargo no se han establecido estudios epidemiológicos que permitan establecer de forma clara una relación entre la morbilidad y la aplicación de pesticidas [4].



---

La determinación de los residuos de pesticidas en alimentos, específicamente en frutos y vegetales adquiere importancia debido a que los mismos usualmente no son tratados como los alimentos empacados y se distribuyen directamente del productor al consumidor. El análisis químico de residuos de estos agroquímicos es un gran desafío debido a los procesos a los cuales debe ser sometida la muestra para asegurar que todos los componentes de interés sean extraídos totalmente de la matriz del fruto, para después ser analizados. Así mismo se requieren equipos que puedan detectar estos compuestos a niveles muy pequeños de hasta  $\mu\text{g/g}$  como los equipos de cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS por sus siglas en inglés) los cuales poseen una sensibilidad elevada y límites de detección que pueden detectar compuestos hasta por el orden de partículas por billón (ppb). Se han aplicado diversas técnicas de extracción para pesticidas en frutos que van desde las más convencionales como la extracción Soxhlet [5,6] y ultrasonido [7,8] hasta las más modernas como fluidos supercríticos [9,10] y extracción asistida por microondas [11,12]. En los últimos 10 años se ha venido aplicando el método QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe) el cual se reporta como un método fácil en su aplicación con resultados altamente confiables [13,14].

En el presente trabajo de investigación se comparará los métodos de extracción QuEChERS y extracción asistida por microondas (MAE) en la determinación de los pesticidas: Aldrín, Heptacloro (familia de los organoclorados) Malatión y Metilparatión (familia de los organofosforados) en fresas (*fragaria Vesca L*) provenientes del sector Cumbote en la Colonia Tovar, Municipio Tovar del estado Aragua, posteriormente se utilizará la técnica de Cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS) para el análisis.



---

---

## 2) JUSTIFICACIÓN

Los pesticidas son biocidas y, por lo tanto, sustancias tóxicas y peligrosas. Sin embargo, estos compuestos al ser usados correctamente pueden prevenir de enfermedades como la malaria y el paludismo, las cuales son transmitidas por insectos y otros vectores como animales, bacterias y microorganismos; también aseguran la disponibilidad de alimentos al proteger las plantaciones de especies indeseables. Sin embargo, el uso indiscriminado de dichos productos, específicamente en el sector agrícola, afecta principalmente al entorno ambiental como el suelo, el agua y la vegetación, estos al persistir y bioacumularse afectan también a la cadena trófica [15]. Tales características generan la preocupación del hombre ante la presencia de residuos de pesticidas en alimentos que pueden afectar su salud al momento de consumirlos. El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA por sus siglas en inglés) logró establecer una lista con los frutos que más absorben pesticidas, entre ellos se encuentra la fresa (*Fragaria Vesca L*), la cual puede retener hasta un 90% de estos productos al momento de su aplicación [16].

La fresa es un producto de alto consumo en Venezuela debido a su agradable sabor, su accesibilidad en costo y a las propiedades nutricionales que se le atribuyen, estudios científicos han demostrado que el consumo periódico de fresas puede traer como consecuencias beneficios potenciales contra el cáncer y enfermedades neurológicas [17,18]. Entre las zonas de mayor producción de fresas en el país se encuentran los Paramos Andinos, estado Mérida, El Jarillo, estado Miranda y la Colonia de Tovar, estado Aragua, en todas ellas existe una aplicación intensa de pesticidas [3].

El análisis de pesticidas a nivel químico es un reto debido a diversas variables que deben ser tomadas en cuenta como: la naturaleza de los pesticidas que se quieren determinar, la matriz en la que se encuentran, la abundancia de estos en dicha matriz, entre otros; es por ello que se presenta la necesidad de desarrollar y aplicar métodos



---

---

de análisis altamente sensibles y confiables para la determinación de dichos compuestos. El paso crítico en este tipo de análisis lo determina el proceso de extracción de los residuos de pesticidas del fruto de forma representativa y exacta para su análisis.

Se han desarrollado numerosos métodos para la extracción de pesticidas en distintas matrices, cada método tiene sus particularidades así como sus ventajas y desventaja [19]. El Método QuEChERS es muy aplicado a nivel mundial para la determinación de residuos de pesticidas en alimentos, debido a las múltiples ventajas que presenta, sin embargo no ha sido establecido como método oficial de análisis. Por otro lado la extracción asistida por microondas es un método útil debido a que se logran recuperaciones muy altas en sistemas cerrados, se emplea poca cantidad de solventes y poco tiempo de extracción. Escasos son los estudios de residuos de pesticidas en fresas que se han publicado a nivel mundial en la actualidad; en Venezuela hasta donde se tiene conocimiento no se ha realizado ninguna publicación al respecto, es por ello que es de suma importancia iniciar los estudios para la determinación de contaminantes orgánicos tipo pesticidas en fresas y otros frutos en nuestro país.



---

---

### 3) REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

#### 3.1) Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPS).

Son compuestos químicos en cuya estructura predominan grupos funcionales orgánicos, se denominan persistentes ya que estos compuestos son poco biodegradables, conservando por largo tiempo su potencial tóxico y cuyas propiedades de bioacumulación y biomagnificación son conocidas [20]. Algunos pesticidas usados en la actualidad están clasificados como orgánicos persistentes.

#### 3.2) Pesticidas.

Muchas definiciones han sido formuladas para los pesticidas, desde las más simples, hasta las más complejas, el diccionario de la real academia española lo define como todo aquello que se destina a combatir plagas [21]. Una definición alterna y simple considerando el sentido etimológico de la palabra sería: aquellos productos o compuestos químicos, utilizados en las zonas agrícolas o en medios urbanos para combatir o aniquilar las plagas.

La FAO a través del código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas amplía la definición de plaguicidas y a su vez hace una clasificación de la siguiente manera: **Un pesticida o plaguicida** es cualquier sustancia o mezclas de sustancias, de carácter orgánico o inorgánico, destinada a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos.



---

---

El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte [22].

### **3.3) Residuo de pesticida.**

Por residuo de pesticida se entiende cualquier sustancia específica, tóxica o contaminante, presente en alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, como consecuencia del uso de plaguicidas. Aquí se incluye cualquier derivado de un plaguicida, como productos de conversión, metabolitos y productos de reacción y las impurezas de importancia toxicológica [22].

### **3.4) Clasificación de los pesticidas.**

Los pesticidas históricamente se han clasificado en función de la especie que se desea combatir, sin embargo actualmente se han desarrollado distintas clasificaciones las más resaltantes se indican a continuación:

#### **3.4.1) Según su actividad.**

Se refiere al tipo de plaga que se desea combatir, es la clasificación mas empleada debido a la utilidad que ofrece a los agricultores que emplean estos productos. En la tabla 1 se muestra la clasificación de los pesticidas según su actividad [23].

**Tabla 1:** Clasificación de pesticidas según su actividad.

<b>INSECTICIDAS</b>	<i>MINERALES</i>	Compuestos arsenicales, compuestos fluorados, azufre, derivados del selenio
	<i>ORGANICOS DE SINTESIS</i>	Organofosforados, organoclorados, carbamatos
	<i>A BASE DE ACEITES MINERALES</i>	Aceites antracénicos, aceites de petróleo
	<i>DE ORIGEN VEGETAL</i>	Nicotina, piretrina, rotenona
<b>HERBICIDAS</b>	<i>MINERALES</i>	Sales de $\text{NH}_4^+$ , $\text{Ca}^{++}$ , $\text{Cu}^{++}$ , $\text{Fe}^{+++}$ , $\text{Mg}^{++}$ , $\text{K}^+$ , $\text{Na}^+$ , en forma de sulfatos, nitratos, cloruros, cloratos.
	<i>ORGANICOS</i>	Fitohormonas, derivados de la urea, triazinas y diazinas derivados de los fenil sustituidos, las quinoxalinas, derivados de la oxiquinoleína, derivados de las tiadizinas y tiadiazoles
	<i>OTROS</i>	Parquat, diquat, piclorame
<b>FUNGUICIDAS</b>	<i>MINERALES</i>	Sales de cobre, compuestos arsenicales
	<i>ORGANOMETALICOS</i>	Derivados órganomercuriales
	<i>ORGANICOS</i>	Carbamatos y ditiocarbamatos, derivados del benceno, amidas, benzonitrilos y aceites minerales
<b>RODENTICIDAS</b>	<i>DERIVADOS CUMANIRICOS</i>	Warfarinas, sales de talio
	<i>INORGANICOS</i>	



---

---

Más de la mitad de los pesticidas que se fabrican son del grupo de los insecticidas debido a que los insectos como los escarabajos, orugas, moscas y mosquitos entre otros son los que más inconvenientes causan a los cultivos originando grandes daños en las cosechas y transmitiendo enfermedades.

#### **3.4.2) Según su regulación.**

Se refiere a la aprobación que tenga el pesticida para ser comercializado o no en una localidad específica, esta aprobación debe ser emitida por las autoridades con competencia en la materia y varía de acuerdo a las regulaciones específicas de cada país [23].

***Pesticida prohibido:*** Son pesticidas del que se han prohibido todos los usos mediante una medida definitiva de reglamentación, con el fin de proteger la salud humana o el ambiente. El término comprende todo producto que no haya sido aprobado para utilizarse por primera vez o que la industria haya retirado del mercado interno de examen ulterior en el proceso nacional de aprobación, cuando haya pruebas claras de que esta medida se ha adoptado con objeto de proteger la salud humana o el ambiente.

***Pesticida rigurosamente restringido:*** Es todo pesticida del que para proteger la salud humana o el ambiente, se han prohibido prácticamente todos los usos mediante una medida definitiva de reglamentación, pero siguen autorizándose ciertos usos específicos. Comprende todo producto al que prácticamente para todos los usos se haya negado la aprobación o que la industria haya retirado ya sea del mercado interno o de consideración ulterior o en el proceso nacional de aprobación cuando existan pruebas claras de que esta medida se ha adoptado para proteger la salud o el ambiente



---

---

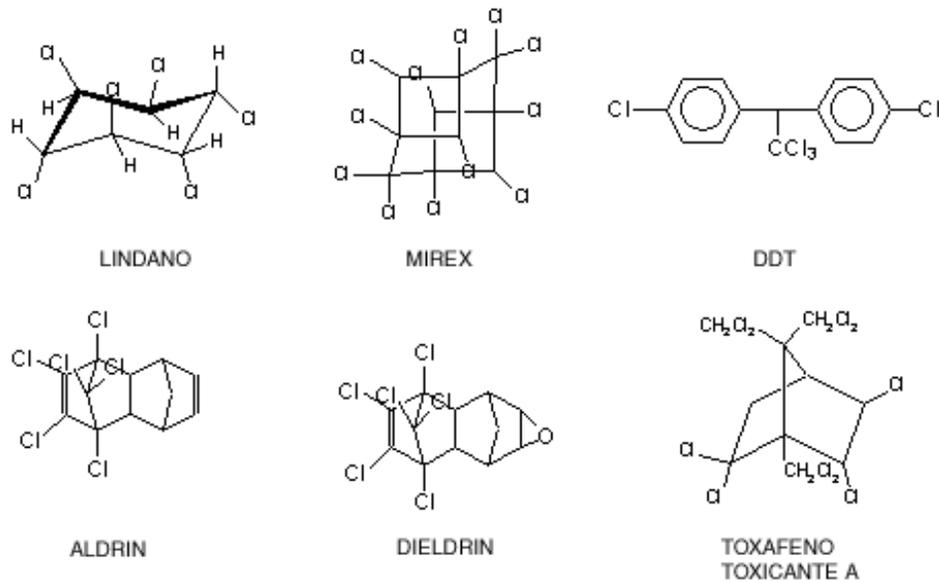
***Pesticida regulado:*** Es aquel pesticida cuya aplicación está permitida siempre que se cumplan con los estándares exigidos por las regulaciones nacionales e internacionales, los fabricantes están obligados a especificar en sus productos las medidas y precauciones que se deben tomar para la correcta aplicación de estos productos. Su venta, distribución y aplicación está controlada y supervisadas por los entes reguladores de la materia. La mayoría de los pesticidas empleados en la actualidad encajan en esta definición

***Pesticida permitido:*** Es aquel pesticida para el cual se ha demostrado con rigurosidad técnica y científica que posee muy poco o ningún impacto en el ambiente, flora, fauna y seres humanos; de forma tal que puede ser aplicado sin más limitaciones que las recomendadas por los entes reguladores o las indicadas por el fabricante

### **3.4.3) Según su composición química.**

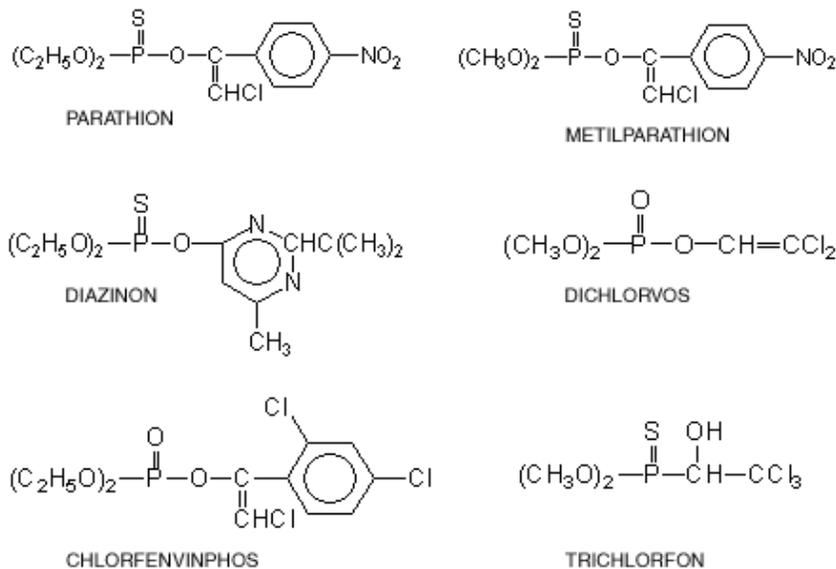
Se refiere a la estructura y a las propiedades químicas de los mismos, algunas clasificaciones son:

***Pesticidas Organoclorados:*** Desde el punto de vista estructural, constituyen un grupo de sustancias, muy heterogéneo, teniendo en común la presencia de estructuras monocíclicas o policíclicas con distinto número de átomos de cloro (figura 1), su estructura química en general corresponde a la de los hidrocarburos clorados teniendo como características comunes su baja solubilidad en agua y su alta solubilidad en la mayoría de los solventes orgánicos, esto ocasiona que dichos compuestos y sus derivados tiendan a acumularse en el tejido graso de los organismos vivos, además este tipo de pesticida se caracteriza por su alta persistencia.



**Figura 1:** Estructura química de algunos pesticidas organoclorados

**Pesticidas organofosforados:** Sus estructuras químicas derivan de la sustitución por restos orgánicos en fósforo pentavalente (figura 2), los pesticidas organofosforados poseen propiedades químicas similares a las de sus pares organoclorados salvo por su baja persistencia de solo algunos días y su toxicidad más aguda.



**Figura 2:** Estructura química de algunos plaguicidas organofosforados

**Pesticidas Carbamatos:** Forman parte de una gran familia de pesticidas entre los que se hallan herbicidas, fungicidas e insecticidas. Todos ellos derivan del ácido carbámico y se dividen en tres grupos [24]: 1-N-metil carbamatos, 2-N,N, dimetil Carbamato, 3-N-fenil Carbamatos.

**Pesticidas Fenoxiacidos:** Se introdujeron alrededor de los años cuarenta con el descubrimiento del 2,4-D derivado del ácido fenoxiacético, son extensamente empleados a nivel mundial y principalmente como herbicida y debido a su gran fortaleza se emplea en bajas dosis

**Pesticidas Piretroides:** Las piretrinas son compuestos derivados del pelitre el cual es una planta herbácea, las piretrinas han sido un tipo de insecticida vegetal muy empleados, pero su utilización en la agricultura ha resultado escasa debido a la poca estabilidad que posee, en las últimas dos décadas se han desarrollado una serie de



---

---

productos derivados del pelitre a los que se le han denominado de forma generica Piretroide, entre las características mas favorables de estos compuestos son las de ser facilmente degradables en el suelo, y no presentar efectos toxicos notables en la salud humana.

#### **3.4.4) Según su ámbito de aplicación.**

Se refiere a los sitios donde debe ser aplicado un pesticida en particular [23].

***Pesticidas Agrícolas:*** Aplicados específicamente para plantas que sirvan por si mismas o a sus frutos para consumo humano o animal.

***Pesticidas Animales:*** Aquellos que ejerzan acción letal sobre cualquier forma de vida parasitaria que afecte directamente a los animales, por extensión se incluyen aquellas sustancias que alteren el ciclo biológico del parásito.

***Pesticidas para Salud Pública:*** Destinados al control de vectores de enfermedades transmisibles al ser humano.

***Pesticidas Industriales:*** Destinados a combatir plagas en establecimientos industriales y cualquier tipo de aditivo industrial que se haga con plaguicidas.

***Pesticidas Domésticos:*** Son aquellos a ser usados en el hogar en ambientes intra y extra domiciliarios, en establecimientos educacionales, recreacionales, asistenciales y en animales domésticos.

#### **3.4.5) Según su toxicidad y/o peligrosidad.**

A los efectos de clasificar los pesticidas según su toxicidad y/o peligrosidad se establecen las categorías siguientes en base a las dosis letales medias agudas, orales



y dérmicas y a las concentraciones letales medias por inhalación según lo establecido en la norma Venezolana COVENIN 2846 [24]

**Tabla 2:** Clasificación de los pesticidas según su toxicidad y peligrosidad por la Comisión Venezolana de Normas Industriales..

Categoría	Vía oral Dosis letal media (mg/Kg)		Vía dérmica Dosis letal media (mg/Kg)		Vía inhalatoria concentración letal 50mg/L aire 4h
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos	Gaseoso
<b>Ia</b> <b>Extremadamente</b> <b>toxico</b>	≤5	≤20	≤10	≤40	≤0.5
<b>Ib</b> <b>Altamente toxico</b>	>5 hasta ≤50	>20 hasta ≤200	>10 hasta ≤100	>40 hasta ≤400	>0.5 hasta ≤2
<b>II</b> <b>Moderadamente</b> <b>Toxico</b>	>50 hasta ≤500	>200 hasta ≤2000	>10 hasta ≤100	>400 hasta ≤4000	>2 hasta ≤20
<b>III</b> <b>Levemente toxico</b>	>50	>2000	>1000	>4000	>20

En Venezuela los pesticidas se clasifican oficialmente según el ámbito de aplicación y evaluación toxicológica, en base a la dosis letal aguda oral, dérmica o inhalatoria. Para decidir la categoría bajo la cual se clasifique toxicológicamente una fórmula dada, los interesados deben suministrar a la autoridad competente las características toxicológicas de la formulación así como los trabajos toxicológicos



---

---

realizados sobre la misma por instituciones oficiales o privadas nacionales o extranjeras de reconocida idoneidad científica.

### **3.5) Propiedades y características de los pesticidas organoclorados y organofosforados.**

Estos pesticidas son de particular interés debido a sus propiedades tóxicas, de bioacumulación y de persistencia superior a las demás familias de pesticidas. Por tanto se procede a extender la información correspondiente a estos dos tipos de pesticidas ya que el presente estudio se basa en estas dos familias de pesticidas.

#### **3.5.1) Pesticidas organoclorados.**

Los pesticidas organoclorados conforman un grupo de plaguicidas desarrollados artificialmente, con el fin principal de controlar a las poblaciones de insectos. Estos pesticidas son, en esencia, hidrocarburos con alto contenido de átomos de cloro. Su origen se remonta a la fabricación del DDT (2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano). El cual fue un arma importante en la lucha química y casi ineludible en el control del mosquito *Anopheles* transmisor de la malaria. El DDT fue el primero de los insecticidas de la segunda generación. Había sido sintetizado en 1874 pero su uso como insecticida comenzó cuando el químico suizo Müller descubrió sus propiedades como veneno para los insectos y su baja toxicidad para los humanos. Se calcula que en los primeros años de uso del DDT se evitó la muerte de 5 millones de personas cada año, además de la protección de cosechas y del aniquilamiento de insectos domésticos. Así, por ejemplo, en la India, en 1952 hubo 75 millones de casos de malaria y en 1964, después de usar masivamente el DDT solamente 100.000 casos [25].



---

---

Sin embargo con el transcurrir de los años se fueron descubriendo algunos importantes problemas asociados al uso del DDT, al punto que se fue prohibiendo su uso cada vez en más países, y descendiendo su producción. Así pues de ser un benefactor de la humanidad pasó a ser enemigo público entre los años 1970 a 1980 y con ello llegó su prohibición. Afortunadamente, su desuso obligó al desarrollo de nuevos insecticidas con propiedades mucho menos peligrosas, pero que igual presentan características de toxicidad de consideración y elevada persistencia, entre estos compuestos desarrollados tenemos el Aldrín, Clordano, Dieldrín, Endrín, Heptacloro, HCH (hexaclorociclohexano), Lindano y Toxafeno. En la actualidad los pesticidas organoclorados incluyen varios grupos:

- a) Grupo de los Ciclodienos:** Aldrín y su epóxido, el Dieldrín, Mirex
- b) Grupo del DDT:** p-p'-DDT, o-p'-DDT, p-p'-Metoxiclor.
- c) Grupo del Hexaclorociclohexano (HCH) y Hexaclorobenceno (HCB):** HCH,  $\gamma$ -HCH, HCB.
- d) Grupo de los indenos clorados:** Heptacloro,  $\alpha$ -Clordano.
- e) Grupo de los terpenos clorados:** Toxafeno.

### 3.5.2) Pesticidas organofosforados.



---

---

El conocimiento de los compuestos organofosforados data ya de 1820 a partir de los trabajos de Lassaigne quien utilizó ácido ortofosfórico y alcoholes para obtener los primeros. En 1854 Clermont sintetiza el Tetraetilpirofosfato (TEPP), aunque sus propiedades insecticidas fueron advertidas 80 años después. Llegado el siglo XX comenzaron las investigaciones a fondo sobre compuestos organofosforados. Las primeras fueron llevadas a cabo por Saunders en Inglaterra y por Schrader en Alemania donde desarrollaron un compuesto de fósforo de extremada toxicidad al que llamaron Tabun. De acuerdo con las regulaciones militares de aquella época, todo compuesto químico producido de muy alta toxicidad debía ser reportado a las autoridades, de esta forma comenzaron a usarse estos compuestos como agentes de guerra química o agentes nerviosos. Esta tecnología bélica fue luego aplicada a áreas civiles al campo de protección de cultivos, utilizándose compuestos similares aunque mucho menos tóxicos como plaguicidas.

Los pesticidas organofosforados son sustancias biodegradables en la naturaleza, sin tendencia a acumularse en las grasas del organismo pero con gran actividad neurotóxica al punto que pueden producir intoxicaciones agudas de gravedad [26]. A pesar de su toxicidad aguda, estos se introdujeron para el control de los insectos en los cultivos debido a su baja persistencia en el medio ambiente, que varían desde días hasta varias semanas. De hecho este tipo de pesticidas junto con los carbamatos y piretroides son los insecticidas más ampliamente utilizados en la actualidad.

Décadas atrás, el paratión era el plaguicida más utilizado en la agricultura. Sin embargo, por su elevada toxicidad su uso está totalmente restringido actualmente (junto con el metil-paratión). Otros organofosforados, menos tóxicos se siguen usando, como el malatión, dimetoato y clorpirifós, pero lentamente están siendo reemplazados por otras nuevas moléculas, como los piretroides o bupiridinilos. Estos pesticidas pueden clasificarse como:



---

---

**a) Derivados de la molécula del ácido fosfórico:** Si los dos primeros oxhidrilos se esterifican con radicales alquílicos se obtienen los alquil-fosfatos o alquil-pirofosfatos por ejemplo: dichlorvos. Si dichos oxhidrilos se sustituyen por amidas se obtienen las fosforamidas como ejemplo tenemos el metamidofós y el acefato.

**b) Derivados de la molécula del ácido fosforotiónico:** De este ácido derivarán a su vez numerosos ésteres tiofosfóricos, el Paratión es uno de ellos.

**c) Derivados del ácido fosfortiolotiónico:** tenemos como ejemplo clásico el Malatión.

**d) Derivados del ácido fosfortiólico:** entre ellos están Malaoxón, Demeton-S-metil

### 3.5.3) Pesticidas organoclorados versus pesticidas organofosforados.

El empleo de un pesticida u otro depende de muchos factores como: oferta, costos, tipo de plaga a eliminar entre otros. A continuación se presenta una tabla comparativa de las propiedades de las dos familias de pesticidas

**Tabla 3:** Tabla comparativa entre los pesticidas organoclorados y organofosforados



PROPIEDAD	ORGANOFOSFORADO	ORGANOCOLORADO
Estabilidad	Muy baja	Elevada
Persistencia	Baja	Alta
Efectos bioacumulativo	no posee	muy grande
Toxicidad aguda	Alta	Baja
Solubilidad en agua	Alta	Baja
Hidrofobicidad	Bajo	Alto
Costo	Alto	Bajo
Selectividad	Alta	Baja

Se puede observar en base a la tabla anterior que estas propiedades están directamente relacionadas con sus propiedades toxicológicas y de persistencia se puede decir que los pesticidas organofosforados causan un mayor impacto a corto plazo debido a su aguda toxicidad y su poco efecto bioacumulativo debido a su baja hidrofobicidad mientras que los pesticidas organoclorados tienen mayor efectos negativos a largo plazo debido a su alta persistencia y los efectos bioacumulativos.

### **3.6) Aplicación de los pesticidas y su influencia en la persistencia y la distribución de residuos permanentes.**



---

---

El movimiento o migración de pesticidas se relaciona estrechamente con la forma de aplicación, y esta a su vez con posibles residuos peligrosos remanentes. Un tipo de aplicación es la directa, la cual considera productos de tipo granular o inyectados. Este tipo de aplicación es la que llega en más altas concentraciones al suelo, aunque de esta forma disminuye la probabilidad de su migración en el medio ambiente.

Otra forma de aplicación es la dispersiva, la cual se origina por la dispersión del producto al momento de su aplicación. Los problemas asociados a este tipo de aplicación ocurren durante el rociado terrestre o aéreo, e involucran distintos parámetros como la formulación del plaguicida, parámetros de aplicación tal como el diseño de la boquilla y propiedades de fluidez, condiciones meteorológicas, altura de liberación y tamaño del área tratada.

Un 30% o más del pesticida puede llegar a moverse 15 metros o más lejos del área tratada durante su aplicación por rociado si las condiciones son ideales para la dispersión, es decir: si se presenten vientos adecuados, si el tamaño de gota favorece o no la dispersión, pues se ha encontrado que las gotas pequeñas producto del rociado, tienden a desplazarse más lejos que las gotas grandes y también que bajo condiciones de una muy ligera brisa (5 Km/h) pequeñas gotas son transportadas a largas distancias [27].

Estas gotas están sujetas a la pérdida de agua por evaporación y a la volatilización química de las mismas, la dispersión produce inevitablemente la migración de residuos de pesticidas causando la contaminación del medio ambiente y de las cosechas cercanas al área tratada. La movilidad de estos compuestos a través del aire o del agua y su acumulación o transformación en el medio donde se aplican ha provocado que se alcancen, en ciertos casos, niveles elevados de ellos en alimentos y en aguas, principales vías de ingreso al consumidor. El problema al consumir residuos de pesticidas es que estos compuestos son lipófilicos y no se metabolizan rápidamente



---

---

acumulándose en las zonas grasas del organismo, facilitando así el fenómeno de biomagnificación, bioacumulación producida a través de la cadena trófica

Evaluar el impacto de un pesticida en la cadena alimenticia es un proceso complejo, ya que un herbicida en teoría aplicado a un solo cultivo puede acabar en función de su persistencia en distintos grupos ambientales como alimentos, suelos, plantas, reservorios de agua, entre otros; afectando a diferentes organismos, como: insectos, ganado, seres humanos e inclusive otros cultivos. Estos hechos han desencadenado una preocupación social que está originando el uso de menores dosis de aplicación y la utilización de sustancias menos tóxicas, menos persistentes y más compatibles con el medio ambiente. La demanda de la sociedad de una mayor seguridad en el uso de los productos fitosanitarios requiere el desarrollo y mejora de la metodología analítica para garantizar la detección de estos compuestos, a niveles muy bajos, en las distintas matrices ambientales y alimentarias.

### **3.7) Métodos de análisis para la determinación de residuos de pesticidas en frutos y vegetales.**

El análisis de residuos y contaminantes en los alimentos supone la determinación de sustancias que se encuentran en cantidades muy pequeñas hasta del orden de  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , en matrices muy complejas. Es preciso por tanto realizar en primer lugar una extracción cuantitativa de las sustancias y posteriormente purificar y/o concentrar los analitos obtenidos, antes de proceder a su detección y cuantificación. A la hora de desarrollar un método analítico, que involucre el conjunto sucesivo de las fases indicadas de extracción, purificación y determinación, es importante considerar todos aquellos factores que pueden influir en la validez del resultado.



---

---

En el caso del análisis de alimentos, los métodos clásicos para preparar las muestras son laboriosos, suponen un gasto de grandes cantidades de disolventes, y suelen necesitar varias etapas de purificación antes de la determinación. Los métodos modernos de preparación de muestras se han desarrollado para superar estos inconvenientes, permitiendo el análisis de un mayor número de muestras, en menor tiempo y con mínimo gasto de reactivos. Aspectos muy importantes en la vigilancia de la salud alimentaria.

### **3.7.1) Métodos de extracción.**

La extracción es la primera etapa de la preparación de la muestra, una vez conseguida la misma de manera homogénea y representativa se procede al análisis. El objetivo de esta etapa del método analítico es aislar el analito de la matriz de la forma más completa posible evitando la presencia de interferencias. Por tanto, hay que evaluar no sólo la naturaleza del analito sino también de la matriz, para que esta etapa sea lo más eficiente posible.

Existen diferentes métodos para la extracción de diferentes tipos de pesticidas en diversas matrices, a continuación, se describen los métodos que son aplicados con más amplitud:

#### **3.7.1.1) Métodos clásicos.**

**Extracción líquido- líquido:** Se basa en el reparto del analito entre dos líquidos inmiscibles. La eficiencia del proceso depende de varios factores como son la afinidad del analito por el disolvente y el número de extracciones sucesivas que se lleven a cabo. El uso de mezclas de disolventes, la adición de sales o el cambio del pH pueden mejorar el rendimiento de la extracción.



**Extracción sólido-líquido:** En el caso de muestras sólidas se lleva a cabo la extracción sólido-líquido en la que los analitos se transfieren desde la matriz al disolvente seleccionado. La eficiencia de la extracción depende de tres factores relacionados entre sí como son la solubilidad, la transferencia de masa y el efecto de la matriz. La solubilidad de un analito depende del tipo de disolvente y está influenciada por la temperatura y la presión. Por otro lado, la transferencia de masa depende del coeficiente de difusión y el tamaño de partícula de la matriz y se ve favorecida por el uso de disolventes de baja viscosidad, la agitación, temperatura y presión elevadas y un tamaño de partícula pequeño. La extracción sólido-líquido se puede realizar de distintas formas dependiendo de la fortaleza de las interacciones entre los analitos y la matriz. La extracción con agitación, la extracción Soxhlet y la extracción asistida por ultrasonidos son los procedimientos de extracción sólido-líquido más utilizados

Estos métodos clásicos son fáciles de utilizar y no requieren un equipamiento especial. Sin embargo, tienen varias desventajas debido al uso de grandes cantidades de material de vidrio y de elevados volúmenes de disolventes orgánicos tóxicos. Por otra parte, el material de vidrio empleado tiene que estar libre de impurezas, por lo que es necesario utilizar reactivos de limpieza altamente oxidantes, lo cual a su vez puede causar la contaminación del medio ambiente. Además, los extractos orgánicos obtenidos tienen que ser concentrados y sometidos a procesos de purificación con el fin de obtener los bajos límites de detección requeridos. Todos estos hechos hacen que los métodos clásicos sean laboriosos y difíciles de automatizar.

Existe un gran interés en el desarrollo de nuevas técnicas de extracción para la preparación de las muestras y su posterior análisis que sean limpias, rápidas, selectivas, y cuya automatización sea posible. A continuación se describen algunas de



---

---

las técnicas modernas de extracción utilizadas en la preparación de muestras para el análisis de residuos de pesticidas.

### 3.7.1.2) Métodos modernos

**Extracción acelerada con solventes (Accelerate Solvent Extraction ASE):** Esta técnica también fue conocida como extracción con líquidos presurizados (PLE Presurized liquid extraction) se emplea desde 1995 y consiste en la extracción de los analitos con un disolvente en caliente y presurizado. Las temperaturas elevadas permiten acelerar la cinética del proceso, mientras que las altas presiones evitan que el disolvente alcance su punto de ebullición, obteniendo una rápida y segura extracción de los analitos de interés. Esta técnica permite el uso de disolventes de distinta polaridad y utiliza un intervalo de presiones de 5 a 200 atmósferas, a fin de mantener el disolvente en estado líquido a temperaturas de hasta 200 °C, empleadas para acelerar dicho proceso de extracción. Con esta técnica se consigue un empleo de solvente 95 % menor que el utilizado en métodos clásicos de extracción. Además del analito hay que tener en cuenta las propiedades físicas de la muestra ya que tienen una gran influencia en la extracción.

La ASE se ha empleado para aislar contaminantes en alimentos con un alto contenido lipídico, como es el caso de los pesticidas organoclorados en hígado de bacalao y filetes de pescado [28] aunque también se ha usado en el análisis de pesticidas en frutas y hortalizas [29] debido a la rapidez y automatización de la extracción, pero requiere de la adquisición de un equipo de elevado costo.

**Extracción con fluidos supercríticos (Supercritical Fluid Extraction SFE):** La extracción con fluidos supercríticos es una técnica que se empezó a desarrollar en la



---

---

década de los 80 y que ha sido muy empleada en la industria agroalimentaria para la obtención de aromas y sabores de especias y hierbas aromáticas, de café y té sin cafeína, de bebidas sin alcohol y otros productos. La técnica consiste en el empleo de un gas, usualmente CO<sub>2</sub>, el cual es sometido a condiciones de presión y temperatura hasta obtener el fluido supercrítico. Estos fluidos tienen densidades similares a las de los líquidos pero con coeficientes de difusión mayores y viscosidades más bajas, similares a la de los gases, lo que permite la extracción de analitos de forma más rápida y eficiente que con líquidos orgánicos. El poder disolvente de un fluido supercrítico puede modificarse por los cambios de la presión y, en menor proporción, por la temperatura. Este método presenta una serie de ventajas entre ellas la posibilidad de obtener extractos concentrados y puros al vaporizarse el fluido supercrítico a presión atmosférica.

La SFE se ha utilizado para la determinación de pesticidas y otros contaminantes orgánicos en frutas y hortalizas [30], también se ha empleado en alimentos de origen animal como carne bovina [31]. Sin embargo, esta técnica no es tan utilizada como otras por el número de variables a optimizar y por carecer de un método universal que funcione con todos los analitos y matrices.

**Extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction SPE):** Los pesticidas son, en general, compuestos de baja polaridad que frecuentemente tienen que ser extraídos de una matriz acuosa o con un alto contenido en agua. En la extracción en fase sólida la muestra se pasa por un cartucho o una columna empaquetada con un adsorbente en el cual quedan retenidos los pesticidas. Una elución subsiguiente con un disolvente orgánico permite obtener los pesticidas en un extracto orgánico concentrado, que normalmente es bastante limpio y puede ser analizado por cromatografía de gases o cromatografía líquida. Los adsorbentes más usados son las alquilsílicas (C<sub>8</sub> y C<sub>18</sub>) y, recientemente, una fase polimérica (Oasis HLB), formada por un copolímero de vinil



---

---

benceno y de vinil pirrolidona, se ha utilizado con buenos resultados, además, también se han empleado tierra de diatomeas o columnas de intercambio catiónico para los compuestos iónicos.

Una de las ventajas de esta técnica de extracción es que es posible automatizarla e incluso acoplarla a sistemas de cromatografía líquida. El acoplamiento directo de la SPE con la cromatografía de gases es más complejo, porque es necesario eliminar cualquier rastro de agua. La técnica de SPE se puede emplear como un proceso que permita la extracción y la purificación simultánea, aunque es más común utilizarla como una etapa de purificación posterior a la extracción del analito por otros procedimientos, como por ejemplo la extracción líquido-líquido. En los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de métodos basados en SPE para determinar pesticidas en distintos tipos de muestras. Entre éstos destacan métodos publicados para pesticidas en bebidas [32], y en varios tipos de alimentos [33]

***Microextracción en fase sólida (Solid Phase Microextraction SPME):*** La microextracción en fase sólida es una técnica que no utiliza disolventes para extraer los analitos y que está basada en el reparto de los analitos entre la matriz y una fibra de sílice fundida cubierta con una fase absorbente, donde se retienen los analitos debido a su mayor afinidad por ella. La SPME se puede aplicar al análisis de matrices líquidas y gaseosas, y los analitos se pueden extraer por inmersión directa (DI, *direct immersion*) en líquidos o mediante el análisis del espacio de cabeza (HS, *headspace*).

Se han desarrollado una gran variedad de métodos SPME para el análisis de pesticidas en diferentes alimentos. La mayoría de estos métodos se han utilizado muestras líquidas, como los zumos de frutas [34] aunque también se ha empleado en algunos sólidos como hortalizas [35].

***Extracción asistida por microondas (Microwave Assisted Extraction MAE):*** En los últimos años la extracción asistida por microondas ha surgido como una clara



---

---

alternativa a diversas extracciones clásicas y modernas debido a que permite un calentamiento más rápido y eficiente de la muestra. Los analitos se extraen aplicando energía de microondas en un disolvente adecuado. Este tipo de radiación permite el calentamiento selectivo de la muestra según el disolvente utilizado. Esta técnica de extracción depende de la matriz y está limitada por los disolventes que se pueden emplear, ya que estos no deben ser transparentes a la radiación de microondas y tener un elevado momento dipolar, sin olvidar la solubilidad de los analitos en los mismos. En general, cuanto mayor sea el momento dipolar del disolvente, mayor será su capacidad de extracción. Así, el hexano, cuyo momento dipolar es prácticamente nulo, es transparente a la radiación de microondas por lo que apenas se calienta cuando se aplica dicha radiación. En cambio, la acetona tiene un momento dipolar más alto y se calienta en pocos segundos, aunque algunos compuestos orgánicos presentan una mejor solubilidad en hexano. Por estos motivos, la mayoría de los métodos desarrollados para la MAE emplean mezclas de hexano y acetona como disolvente de extracción. Las muestras junto con el disolvente de extracción se irradian con las microondas durante cortos periodos de tiempo y como consecuencia se produce un aumento de la temperatura que favorece la transferencia de los compuestos retenidos en la matriz hacia el disolvente. Esta técnica extractiva es rápida, ya que los tiempos de irradiación son muy cortos y, además, se pueden extraer varias muestras simultáneamente. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes tales como la dificultad de ser automatizada o acoplada a las técnicas de análisis, así como la necesidad de centrifugar o filtrar la muestra después del proceso de extracción.

Los parámetros a tener en cuenta a la hora de optimizar un método basado en la extracción MAE son la composición del agente de extracción y su volumen, la temperatura y el tiempo de extracción, así como la naturaleza de la matriz. La temperatura juega un papel muy importante en el proceso, ya que un aumento de la temperatura se refleja en una mayor capacidad del disolvente para solubilizar los analitos, pero hay que tener cuidado con la posible degradación de los mismos. La



---

---

extracción de pesticidas en frutas y hortalizas basada en la MAE ha dado muy buenos resultados. Así, por ejemplo, empleando acetona-hexano (1:1) se han podido determinar pesticidas organoclorados y organofosforados en legumbres y vegetales [36] en naranjas [37].

***Método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe):*** En 2003, Anastassaides y colaboradores desarrollaron un método para determinar residuos de pesticidas en frutas y hortalizas al que denominaron QuEChERS que son las siglas de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*, es decir, rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro [38]. Este nuevo método de preparación de muestras surgió de la necesidad de desarrollar métodos multiresiduos rápidos y económicos que proporcionen resultados de gran calidad y fiabilidad. El método QuEChERS ofrece varias ventajas como: poco uso de reactivos (solo son necesarios tres compuestos), material de laboratorio y espacio físico (poco material de vidrio por lo cual puede ser manejado por un operador en un espacio reducido), el tiempo requerido para aplicar el método es bastante corto comparado con otros métodos (se pueden procesar hasta ocho muestras en treinta minutos), ofrece altas recuperaciones y resultados precisos y exactos (en términos de reproducibilidad, y exactitud). El proceso consta de dos etapas: la primera es de extracción y homogenización de la muestra donde interviene un disolvente orgánico y una mezcla de sales y el segundo proceso es el de limpieza donde se lleva a cabo una extracción dispersiva en fase sólida de la muestra para transferir los analitos a un solvente adecuado, es importante destacar que este método fue diseñado y es aplicado exclusivamente para la determinación de pesticidas en diferentes matrices. Esta técnica ha permitido determinar un elevado número de pesticidas pertenecientes a diferentes familias químicas en alimentos de origen vegetal tales como uvas [39] y hortalizas [40].

### **3.7.1.3) Comparación de los métodos en la extracción de residuos de pesticidas.**



La elección del método adecuado para el análisis de residuos de pesticidas depende de una serie de factores. La naturaleza de la matriz y las características de los analitos muchas veces determinan la técnica de extracción adecuada para preparar extractos aptos para su análisis instrumental, ya que no existe un método universal aplicable para todo tipo de muestras. En la siguiente tabla se muestran las ventajas e inconvenientes de las técnicas de extracción descritas para comparar las bondades de cada método.

**Tabla 4:** Tabla comparativa de ventajas y desventajas de algunos métodos de extracción.

Método de extracción	Ventajas	Desventajas
Extracción con agitación	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Simple</li><li>✓ Bajo costo</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Alto gasto de solventes</li><li>✓ Requiere filtración</li><li>✓ Posible formación de emulsiones</li></ul>
Extracción Soxhlet	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Fácil manejo</li><li>✓ Bajo costo</li><li>✓ No requiere filtración</li><li>✓ No depende de la matriz</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Proceso lento que va de 6 a 48 horas</li><li>✓ Alto consumo de solventes y agua para refrigerar.</li></ul>
Extracción con ultrasonidos	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Bajo costo</li><li>✓ Rápido</li><li>✓ No depende de la matriz</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Alto consumo de solventes</li><li>✓ Requiere filtración</li><li>✓ Requiere una cantidad elevada de muestra</li><li>✓ Baja eficiencia</li></ul>
Extracción acelerada con	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Rápido</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Extracciones poco</li></ul>



solventes	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Bajo consumo de solventes</li><li>✓ No requiere filtrar</li><li>✓ Sistema automatizado de fácil acoplamiento con cromatografos</li></ul>	selectivas <ul style="list-style-type: none"><li>✓ El equipo tiene un costo elevado</li></ul>
Extracción en fase sólida	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Rápido</li><li>✓ Extracción de compuestos volátiles y no volátiles</li><li>✓ Bajo consumo de solventes</li><li>✓ Automatizable</li><li>✓ Gran cantidad de adsorbentes.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ El material del cartucho puede generar interferencias o adsorber irreversiblemente el analito</li><li>✓ El empaquetado del adsorbente debe ser uniforme</li></ul>
Microextracción en fase sólida	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Extracción rápida</li><li>✓ Consumo de disolvente mínimo o nulo</li><li>✓ Automatizable</li><li>✓ Las fibras pueden ser utilizadas varias veces</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Problemas de reproducibilidad</li></ul>
Extracción asistida por microondas	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Extracción rápida</li><li>✓ Bajo consumo de solventes</li><li>✓ Extracción simultanea de varias muestras</li><li>✓ Altas recuperaciones para sistemas cerrados</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ El disolvente debe absorber la energía de microondas</li><li>✓ Es necesaria una posterior filtración o separación</li><li>✓ Poca selectividad en la extracción</li></ul>
QuEChERS	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Extracción rápida</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ La extracción debe</li></ul>



---

---

	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Bajo consumo de solventes</li><li>✓ Parámetros analíticos de alta calidad</li></ul>	<p>hacerse manual</p> <ul style="list-style-type: none"><li>✓ Baja selectividad en la extracción</li><li>✓ Extractos no concentrados</li></ul>
--	---	--

Estos métodos de extracción se aplican a diversas matrices de alimentos entre ellos frutos y vegetales, para los métodos clásicos las ventajas en común es su simplicidad y el empleo de material poco costoso, las desventajas de este tipo de método es la lentitud que involucra el proceso y el alto gasto de solventes y reactivos. Se observa que los métodos modernos tienen diversas características comunes y buenas ventajas como lo son el poco tiempo que emplean para lograr la extracción, el bajo consumo de solventes y reactivos sin embargo también hay inconvenientes como la baja selectividad y reproducibilidad, la elección de un método u otro depende de diversos factores como los recursos disponibles, el tipo de muestra a analizar, el grado de precisión y exactitud que requiere el análisis.

### 3.7.2) Métodos de análisis.

La detección de residuos de pesticidas requiere de métodos de análisis sensibles y precisos para las cuales se ha desarrollado técnicas que en su mayoría se basan en separaciones cromatográficas. De estas la cromatografía de gases con espectrometría de masas ha tenido la mayor aceptación y aplicación debido a que emplea un detector de respuesta universal y se puede utilizar tanto para análisis cualitativo como cuantitativo para una gran variedad de pesticidas.



---

---

### 3.7.2.1) Cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS).

La cromatografía de gases es una técnica ampliamente usada en la determinación de residuos de pesticidas empleando distintos tipos de detectores para el análisis de los mismos. Entre los detectores más usados se encuentran: el detector de captura de electrones (ECD), el cual es muy sensible a compuestos que tienen grupos funcionales electronegativos tales como halógenos y grupos nitro, el detector nitrógeno-fosforo(NPD), se emplea en la detección de pesticidas que contienen átomos de nitrógeno o fosforo en su estructura como las triazinas y los organofosforados.

Actualmente la cromatografía de gases con espectrometría de masas se ha implantado como la técnica más usada en el análisis de residuos de pesticidas, pudiendo determinar e identificar selectivamente compuestos de intereses a niveles de concentración muy bajos en matrices muy complejas. La adquisición de datos se puede llevar a cabo de dos modos distintos: cuando se trabaja en el modo de barrido se detecta un intervalo de masas específico, mientras que si se trabaja en el modo de ión selectivo solo se detecta las masas específicas de los compuestos de interés. Las partes fundamentales de un espectrómetro de masas son: la fuente de ionización, que genera los iones en fase gaseosa; la fuente de impacto electrónico es la más común ya que genera un gran número de fragmentos de masa característicos y de los cuales existen bases de datos que se pueden consultar y comparar con los espectros de una multitud de compuestos lo cual conlleva a una identificación muy acertada del compuesto de interés. El otro componente es el analizador de masas donde estos iones se separan en función de su relación masa/carga.

En la actualidad también se está empleando la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas en tándem (GC/MS-MS), esta configuración es mucho más sensible y selectiva que la anterior. La espectrometría de masas en tándem funciona de la siguiente manera: en el primer espectrómetro, equipado con una fuente



---

---

de ionización ocurre la ionización química de las moléculas de los distintos componentes que integran la mezcla, esta ionización conlleva a poca fragmentación de dichos iones posteriormente se aíslan y pasan al segundo espectrómetro donde los iones son fragmentados nuevamente para dar una nueva serie de espectros de masa, uno por cada uno de los iones moleculares obtenidos en el primer espectrómetro, consiguiendo de esta manera una selectividad y sensibilidad muy elevada.

### **3.8) Área de muestreo.**

#### **3.8.1) Información General.**

El área de estudio seleccionada es el sector Cumbote de la población de la Colonia de Tovar, capital del municipio Tovar del estado Aragua. Es una zona que depende básicamente de la agricultura y el turismo gracias al clima húmedo y templado que allí se encuentra. Se ubica a 42Km de la Capital de Venezuela a una altitud de aproximadamente 2200 metros sobre el nivel del mar. El municipio Tovar se extiende a una superficie de 289.23 Km<sup>2</sup> representando un 4,02% del territorio regional, con una población aproximada de 20000 habitantes y una densidad de población aproximada de 69 hab/Km<sup>2</sup> con una alta tasa de crecimiento demográfico en los últimos diez años del 11% anual [41].

#### **3.8.2) Ubicación.**

La ciudad se encuentra ubicada en el norte del estado de Aragua. El municipio tiene forma de «L»(figura 3), y limita por el norte con el mar Caribe, el noreste con el estado Vargas, el este con el municipio Libertador del Distrito Capital, por el sur limita

con el río Aragua y por el este con el municipio Santiago Mariño del estado Aragua. Las coordenadas geográficas de ubicación son: Latitud **10° 25' N** Longitud **67° 18' O**.



**Figura 3:** Ubicación y límites del Municipio Tovar del estado Aragua

### 3.8.3) Geografía.

La Colonia Tovar está asentada en una orografía muy accidentada, con quebradas y riachuelos. Prevalecen los paisajes de montaña de aspecto neblinoso característico de la cordillera de la Costa (un alineamiento montañoso frente las costas



---

---

venezolanas del mar Caribe), en la que destaca la mayor altura del estado Aragua, el pico Codazzi de 2.429 msnm, ubicado al norte del pueblo. El bosque nublado caracteriza la vegetación predominante que cambia mientras baja los peldaños del relieve como bosque de galería y termina con hierbajos de sabana hacia el sur y xerófila en el norte marino.

#### **3.8.4) Hidrología y Meteorología.**

La temperatura media anual es de 16,8°C y el monto pluviométrico anual es de 1271mm de agua. La hidrografía del municipio Tovar se divide en tres grandes cuencas: la del mar Caribe, formada por los ríos: San Miguel, Ocumare, Cata, Aroa y Tuy; la del río Orinoco, formada por el río Memo y el río Guárico; y la endorreica del lago de Valencia donde vierten sus aguas los ríos Aragua, Turmero, Maracay, Tapa-tapa, Tocarón y Las Minas. El río Aragua, límite sur de la Colonia Tovar, se forma de la confluencia de los ríos Gabante y Curtidor, a nivel de «Pie de Cerro», al norte de La Victoria. El río Gabante, a su vez, se tiene como tributaria a la Quebrada Honda, mientras que el río Curtidor convergen el río San Carlos y la Quebrada de Coche. Todos estos ríos y quebradas nacen en las altas montañas que rodean la Colonia Tovar.

#### **3.8.5) Economía.**

La economía de la región se basa en la agricultura, los colonieros se diseminaron por los terrenos aledaños al valle cuando comenzó el auge de la explotación cafetera. Luego el cultivo de sus legumbres, frutas y verduras consiguieron buen mercado en Caracas y La Victoria. Se desarrolla una agricultura intensiva (horto-fruticultura) de alta productividad y rentabilidad: flores, fresas, tomates, duraznos, ajos, melocotones y



---

---

demás cultivos de clima templado. También se encuentran instalados talleres artesanales de cerámica, fábricas de embutidos, galletas y dulces, industrias cerveceras, conservas de alimentos (mermeladas, duraznos en almíbar, entre otros.), además de las actividades tradicionales agropecuarias que se traducen en la comercialización de hortalizas, frutas, flores, carne de cerdo y sus derivados, Tovar también produce toneles de madera de calidad, que gozan de fama dentro y fuera de la montaña.

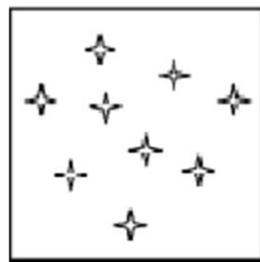
### **3.8.6) Empleo de pesticidas en la región.**

La Colonia de Tovar vive principalmente de la agricultura y del turismo, esta agricultura es ejercida con intensidad al punto que estudios sociales y científicos han dado a conocer esta realidad [3,4] la aplicación de este tipo de compuestos suele no tener un control adecuado para evitar la contaminación del medio ambiente y la posible persistencia de este tipo de compuestos que pudiesen afectar la salud de los consumidores de sus productos.

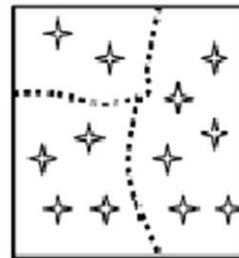
Actualmente los productores de campo de estas zonas suelen emplear los pesticidas que encuentren en el mercado muchas veces emplean los pesticidas equivocados para atacar cierto tipo de plagas debido a la mala asesoría de los comerciantes, esto los ha llevado a aplicar cocteles de diversos pesticidas para tener certeza de poder atacar un amplio espectro de las plagas. Esto aunado a la creencia popular de que entre más cantidades apliques mejor se puede encontrar residuos de pesticidas en los productos destinados al consumo humano. Por estas razones se decidió tomar una muestra proveniente de este lugar que sea representativa del mismo y que haya sido expuesta a la aplicación de pesticidas de forma continua.

### 3.9) Muestreo por Codex Alimentarius.

En la zona de muestreo se recogen porciones de muestras que fueron expuestas a diversos pesticidas, la idea es obtener una muestra representativa del lugar a la cual se le aplicará los métodos de extracción estudiados para determinar si hay presencia o no de residuos de pesticidas. El muestreo se lleva a cabo siguiendo las recomendaciones establecidas por el codex alimentarius [22], para ello es necesario tomar muestras elementales de un lote. Se define Se define como muestra elemental o primaria una pequeña cantidad de fruto extraído de cualquier parte de un lote, siendo lote una porción determinada de terreno donde se pretende muestrear y el cual supone las mismas características para cada producto de forma tal que cada producto individual es representativo de cualquier otro en el mismo lote. Es importante determinar si el lote tiene una delimitación regular como por ejemplo un lote rectangular o si por el contrario es de superficie irregular pues la forma de muestrear cada lote es distinta, la toma de las muestras elementales debe ser al azar y en diferentes puntos y niveles del lote. A continuación se muestra un diagrama de cómo se debe realizar el muestreo en función de la uniformidad del lote muestreado.



**Lotes uniformes**



**Lotes no uniformes**

**Figura 4:** Diagrama de cómo se debe realizar el muestreo en función de la uniformidad del lote muestreado.



---

---

Una vez llevado a cabo el muestreo se debe realizar el informe de muestreo por parte de la persona que tomó las muestras el cual debe contener:

- ✓ Nombre de la persona que realiza el muestreo
- ✓ Fecha y hora de muestreo
- ✓ Lote y porción del lote donde se está muestreando
- ✓ Número de unidades tomadas
- ✓ Condiciones climáticas durante la toma de muestra
- ✓ Cualquier otra observación que se tenga a bien indicar

Después de realizar el muestreo primario se unen las muestras elementales para conformar lo que se denomina una muestra global, esta última es homogenizada y de allí se extrae una porción denominada muestra de laboratorio la cual es destinada para los análisis pertinentes y que es representativa del lote muestreado.

### **3.10) Pesticidas a Estudiar.**

Se presenta a continuación las propiedades físicas y químicas de los pesticidas a estudiar así como sus características toxicológicas [42], para llevar a cabo el estudio se seleccionó dos pesticidas de la familia de los organoclorados: el Heptacloro y el Aldrín y dos pesticidas de la familia de los organofosforados: el Metilparatión y el Malatión.

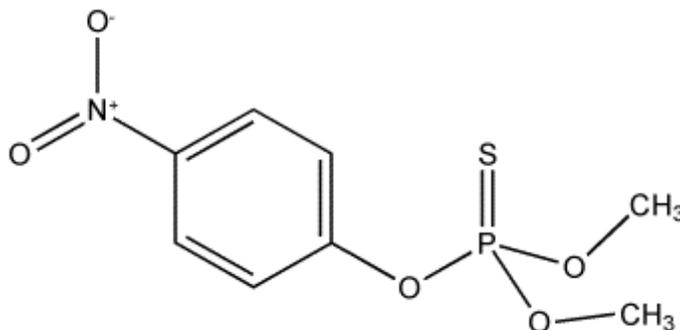
#### **3.10.1) Metilparatión.**

El Metilparatión es un pesticida de la familia de los organofosforados, se emplea en el combate de diversas plagas, entre las que destaca: hormigas, piojos, termitas y otras plagas similares. Se presenta a continuación información acerca de las

propiedades físicas y químicas más importantes para este compuesto así como su estructura, se hace referencia también a las propiedades toxicológicas tanto para el ambiente como para los seres humanos, la tabla 5 muestra las propiedades físicas y químicas así como las características toxicológicas para esta sustancia .

**Tabla 5:** características, propiedades físicas y químicas del Metilparatión.

<b>Nombre IUPAC</b>	O,O-Dimetil -O-4-nitrofenilfosforotioato
<b>Formula Condensada</b>	$C_8H_{10}NO_5PS$
<b>Peso Molecular</b>	263,21
<b>Punto de fusión</b>	35-38°C
<b>Punto de ebullición</b>	119°C
<b>Densidad</b>	1,36g/ml
<b>Solubilidad en agua</b>	50mg/L
<b>Presión de Vapor</b>	0,13 Pa a 25°C
<b>Persistencia</b>	Baja, metil paraoxono como producto de degradación
<b>Nombres comerciales</b>	Metil niran; Metiltiofos; Metron; Nitrox;



**Figura 5:** Estructura química del Metilparatión



---

---

***Peligros y riesgos conocidos respecto a la salud humana:*** El Metilparatión es un pesticida con una alta toxicidad aunque una baja persistencia, su ingreso en cuerpo humano ocurre por inhalación e ingestión principalmente y por absorción dérmica en menor grado. La exposición continua a dosis elevadas del producto puede ser fatal para el ser humano. Una persona que esta intoxicada con Metilparatión puede presentar diversos síntomas como: goteo de nariz, tos, molestias al pecho, falta de respiración y fluidos en los bronquios.

El envenenamiento grave por cualquier vía afecta el sistema nervioso central, produciendo incoordinación, alteración en el habla, pérdida de reflejos, debilidad, fatiga, contracciones involuntarias de los músculos, temblores de la lengua o de los párpados, y finalmente parálisis de las extremidades y de los músculos respiratorios. Otros efectos son defecación y urinación involuntarias, psicosis, ritmo cardiaco irregular, inconsciencia, convulsiones y coma. La muerte puede ser causada por fallo respiratorio o paro cardiaco. Una exposición repetida o prolongada a niveles moderados por ejemplo, entre los trabajadores de una fábrica, puede resultar en problemas de memoria y de concentración, desorientación, depresión, irritabilidad, pesadillas, sonambulismo y somnolencia o insomnio. Las personas que manipulan cantidades de Metilparatión concentrado están a alto riesgo. La exposición para los trabajadores agrícolas puede ocurrir durante el mezclado, rociado o aplicación; durante la limpieza o reparación de los equipos o entrando de nuevo en los campos que han sido rociados.

***Peligros y riesgos conocidos respecto al ambiente:*** El Metilparatión tiene una baja persistencia en el ambiente, no es bioacumulable y no se transfiere a través de la cadena alimentaria, esto es una ventaja indudable para el ambiente pues el mismo es degradado rápidamente bien sea por sí mismo o por algunos microorganismos y otras formas de vida. Es probable que cause daños a ecosistemas en casos de fuerte sobre exposición resultante del uso indebido o de derrames accidentales. También puede ser transportado por insectos polinizadores y otros organismos que están a riesgo del



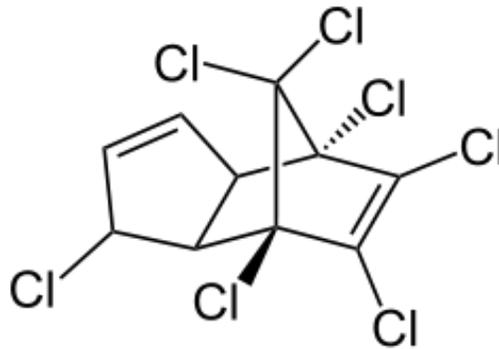
rociado con Metilparatión. La sustancia es muy tóxica para los organismos acuáticos por lo tanto la contaminación de aguas debe ser evitada.

### 3.10.2) Heptacloro.

El Heptacloro es un pesticida de la familia de los organoclorados, está restringido en muchos países debido a su alta persistencia, se ha empleado tradicionalmente como insecticida de suelos para el control de insectos principalmente. Se presenta a continuación información acerca de las propiedades físicas y químicas más importantes para este compuesto así como su estructura, se hace referencia también a las propiedades toxicológicas tanto para el ambiente como para los seres humanos, la tabla 6 muestra las propiedades físicas y químicas así como las características toxicológicas para esta sustancia.

**Tabla 6:** características, propiedades físicas y químicas del Heptacloro.

<b>Nombre IUPAC</b>	1,4,5,6,7,8,8-heptacloro-3a,4,7,7a-tetrahidro-4,7-metanoindeno
<b>Formula Condensada</b>	$C_{10}H_5Cl_7$
<b>Peso Molecular</b>	373,3 g/mol
<b>Punto de fusión</b>	95-96°C
<b>Punto de ebullición</b>	160°C
<b>Densidad</b>	1,58 g/ml a 25°C
<b>Solubilidad en agua</b>	0,056 mg/L a 25°C
<b>Presión de Vapor</b>	0,053Pa a 25°C
<b>Persistencia</b>	Muy alta
<b>Nombres comerciales</b>	Aahepta, Basaklor, Drinox, Heptagran,



**Figura 6:** Estructura química del Heptacloro

***Peligros y riesgos conocidos respecto a la salud humana:*** El Heptacloro es un compuesto orgánico persistente y tóxico para los humanos, es bioacumulable en el organismo por lo que la exposición prolongada es la que causa mayores efectos negativos. Los síntomas de sobreexposición al Heptacloro incluyen, hiperexcitación del sistema nervioso central y daños al hígado. Estudios en trabajadores y rociadores de Heptacloro han demostrado significantes incrementos de muertes por enfermedades cerebro vascular ECV. Se ha encontrado que el Heptacloro tiene efectos significativos en la progesterona y en los niveles de estrógeno en ratas de laboratorio por lo que se sospecha que puede tener efectos teratógenos y de fertilidad. De preocupación particular es su demostrada respuesta carcinogénica en roedores de laboratorio y su potencial impacto para la salud humana por la difundida contaminación medioambiental en la cadena alimentaria.

***Peligros y riesgos conocidos respecto al medio ambiente:*** El Heptacloro es un compuesto altamente persistente está sujeto a transporte de largo alcance posee una alta toxicidad para las especies animales especialmente las acuáticas. La característica



---

---

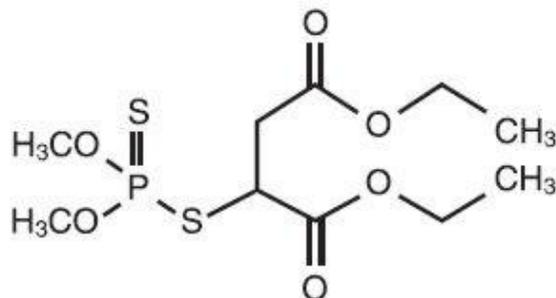
del Heptacloro para bioacumular podría producir efectos crónicos secundarios en organismos expuestos y posible biomagnificación en la cadena alimentaria, por tanto sus implicaciones negativas al medio ambiente son tan delicadas que este compuesto se ha restringido su uso en la mayoría de los países. El Heptacloro posee dobles enlaces los cuales son susceptibles a la adición de oxígeno por tanto su forma epóxida tiene mayor persistencia teniendo una desintegración media de aproximadamente 250 días en algunos sitios se han detectado cantidades mínimas de este compuesto en el suelo de 14 a 16 años después de la aplicación, debido a su prolongado período de permanencia, incluso una baja movilidad puede dar como resultado un movimiento apreciable; por ello cabe considerar que el Heptacloro y su metabolito, el epóxido de Heptacloro, plantean un riesgo de contaminación de las aguas subterráneas con el tiempo.

### **3.10.3) Malatión.**

El Malatión es un pesticida sintético de la familia de los organofosforados, es un compuesto poco persistente pero de una toxicidad aguda, se ha empleado principalmente para combatir piojos en humanos y pulgas en animales domésticos, también se ha empleado para combatir mosquitos y la mosca de fruta que afectan los sembradíos. En la siguiente tabla se muestra las propiedades físicas y químicas más importantes para este compuesto, posteriormente se muestra su estructura química y se hace referencia también a las propiedades toxicológicas tanto para el ambiente como para los seres humanos, la tabla 7 muestra las propiedades físicas y químicas así como las características toxicológicas para este compuesto .

**Tabla 7:** características, propiedades físicas y químicas del Malatión.

<b>Nombre IUPAC</b>	S-1,2-bis-(etoxi-carbonil)-etil -O,O-dimetil-ditiofosfato
<b>Formula Condensada</b>	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$
<b>Peso Molecular</b>	330,36 g/mol
<b>Punto de fusión</b>	3°C
<b>Punto de ebullición</b>	156-157°C
<b>Densidad</b>	1,23 g/cm <sup>3</sup> a 25°C
<b>Solubilidad en agua</b>	145 mg/L a 25°C;
<b>Presión de Vapor</b>	0,016Pa a 25°C
<b>Persistencia</b>	Baja, malaoxono como producto de degradación
<b>Nombres comerciales</b>	Afrathion-50, Malafin 50, Malafor 50,



**Figura 7:** estructura química del Malatión



---

---

***Peligros y riesgos conocidos respecto a la salud humana:*** El Malatión es un neurotóxico con una toxicidad aguda que afecta al sistema nervioso central inhibiendo la acción de la enzima acetilcolinesterasa, no se acumula en el organismo degradándose una vez que ingresa en él. El Malatión ingresa al organismo principalmente a través de la respiración y la vía cutánea, siendo absorbido a través del intestino, puede ingresar al organismo como residuo contenido en los alimentos como cereales, legumbres y verduras que han sido cultivados en tierras tratadas con este compuesto. Esta vía es importante, razón por la cual tanto la OMS como la FAO y la Comunidad Europea publicaron recomendaciones sobre concentraciones residuales admisibles.

Las intoxicaciones agudas se manifiestan en súbitos accesos de transpiración, abundante secreción de saliva, diarrea, bronquitis, infarto al miocardio y coma. La muerte sobreviene por paro respiratorio en caso de complicaciones. Aunque no se dispone de datos concluyentes sobre la teratogeneidad y la acción sobre la fertilidad del Malatión se ha detectado que el mismo puede producir alteración de los genes y de los cromosomas humanos pueden provocar numerosos trastornos orgánicos, entre ellos cáncer. Debido a que el Malatión tiene una toxicidad aguda sin acumularse los peores casos de intoxicación ocurren cuando hay sobreexposición al compuesto como en casos ocupacionales.

***Peligros y riesgos conocidos respecto al ambiente:*** El Malatión llega a la atmósfera debido principalmente a los procedimientos de aplicación utilizados en agricultura. Después de su aplicación se detecta su presencia en el aire sobre las áreas agrícolas tratadas, esto causa que pueda ser trasladado grandes distancias dependiendo de los factores ambientales como viento y humedad. En cuanto a su acción sobre la fauna, el Malatión se degrada dentro de las 24 horas y es expulsado por vía urinaria, esto se



---

---

demostró en ensayos con gallinas y vacas. Su acción sobre ambientes acuáticos es delicada, el tiempo medio para la descomposición química en el agua es de unos 11 días y depende del pH, donde se determinó que su degradación se favorece a valores de pH básicos. El compuesto de degradación principal del Malatión se obtiene por oxidación del mismo y se llama malaoxono, de la hidrólisis resultan, además, derivados del ácido succínico y de otros ácidos carboxílicos, así como ácido fosfórico y O,O-dimetiltiofosfórico.

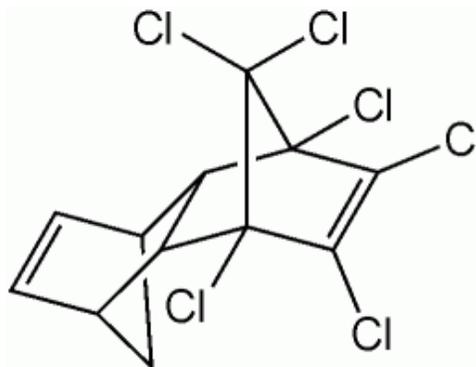
El Malatión en los suelos se degrada rápidamente debido a la actividad de bacterias presentes formando diversos compuestos entre ellos el ácido malatión monocarboxílico, ácido malatión dicarboxílico y diversos fosfotiónatos como resultado de la descomposición de la carboxilesterasa. Además, la actividad de la enzima fosfatasa produce dimetil malation, fosfomonotiónatos y fosfoditionatos, ácido 4-carbono dicarboxílico y los etilésteres correspondientes. Los casos de contaminación de aguas subterráneas son poco comunes debido principalmente a que el Malatión es degradado en el suelo antes de llegar a ellas.

#### **3.10.4) Aldrín.**

El Aldrín es un pesticida de la familia de los organoclorados, con una alta persistencia, este pesticida además de emplearse como insecticida se emplea para combatir diversos hongos que causan enfermedades en las plantas. Se presenta a continuación información acerca de las propiedades físicas y químicas más importantes para este compuesto así como su estructura, se hace referencia también a las propiedades toxicológicas tanto para el ambiente como para los seres humanos, la tabla 8 muestra las propiedades físicas y químicas así como las características toxicológicas para este compuesto.

**Tabla 8:** características, propiedades físicas y químicas del Aldrín.

<b>Nombre IUPAC</b>	1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,2,4 $\alpha$ ,5,8,8 $\alpha$ -hexahidro-1,4-endo,exo-5,8-dimetanonaftalina
<b>Formula Condensada</b>	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>
<b>Peso Molecular</b>	364,7 g/mol
<b>Punto de fusión</b>	104°C
<b>Punto de ebullición</b>	145°C
<b>Densidad</b>	1,54°C
<b>Solubilidad en agua</b>	0,027 mg/L
<b>Presión de Vapor</b>	0,0086Pa a 25°C
<b>Persistencia</b>	Muy alta
<b>Nombres comerciales</b>	Aldrec®, Aldrex®, Drinox®, Octalene®,



**Figura 8:** Estructura química del Aldrín



---

---

***Peligros y riesgos conocidos respecto a la salud humana:*** La exposición al Aldrín ocurre principalmente al comer alimentos contaminados, tales como tubérculos comestibles, pescados o mariscos. El Aldrín se acumula en el cuerpo si hay sobreexposición o exposición continua y puede perjudicar el sistema nervioso. Personas que han ingerido intencionalmente o accidentalmente cantidades grandes de Aldrín han sufrido convulsiones y algunas fallecieron por complicaciones asociadas. Efectos sobre la salud también pueden ocurrir después de un período de exposición prolongado a cantidades debido a sus propiedades de bioacumulación. Algunos trabajadores expuestos por largo tiempo a niveles moderados en el aire experimentaron por largo tiempo diversos síntomas como dolores de cabeza, mareo, irritabilidad, vómitos y movimientos musculares sin control. Los trabajadores que fueron removidos de la fuente de exposición se recuperaron rápidamente de la mayoría de estos efectos.

***Peligros y riesgos conocidos respecto al ambiente:*** El Aldrín es estable por largos períodos de tiempo presentando características conocidas como liposolubilidad, bioacumulación y persistencia en el medio ambiente por tanto se clasifica como Contaminante Orgánico Persistente (COP), además puede ser transportado a grandes distancias por vía atmosférica. Por estas razones su uso está restringido en gran parte del mundo. El Aldrín tiene aplicaciones como insecticida de amplio espectro para protección de cultivos y contra termitas, gusanos, escarabajos, saltamontes, entre otros. También en las semillas de arroz y contra infestaciones de hormigas y termitas en estructuras de madera. El Dieldrín es el producto de degradación principal del Aldrín, aunque también puede encontrarse comercialmente como ingrediente activo.

Se ha encontrado que el Aldrín es fotosensible aunque su degradación es lenta y se degrada a otros productos que también persisten en el ambiente fijándose firmemente en el suelo y haciendo que algunas plantas lo almacenen, los productos de esta transformación se denominan generalmente “fotoaldrín” y “fotodieldrín” y para algunas especies pueden ser más tóxicos que los compuestos originales.



---

---

Los animales expuestos a cantidades altas de Aldrín también sufrieron efectos del sistema nervioso. En animales, la exposición oral prolongada a niveles más bajos también afectó el hígado y disminuyó su capacidad para combatir infecciones. Hasta el presente no se ha logrado extrapolar estos resultados para determinar si el Aldrín perjudica la capacidad de seres humanos para combatir enfermedades. Así mismo los estudios en animales han proporcionado resultados contradictorios acerca de si el Aldrín perjudica la reproducción en machos o si esta sustancia puede alterar del alguna forma los espermatozoides, por tanto la influencia del Aldrín sobre la reproducción de los seres humanos no ha sido establecida.

Las Normas internacionales para el agua potable de la OMS sugirieron que la contribución de los residuos de plaguicidas que puede haber en sistemas de abastecimiento de agua comunitarios a la ingesta diaria total de plaguicidas por la población abastecida es mínima. Como el Aldrín es poco soluble en agua las contaminaciones graves pueden ocurrir por derrames de altas cantidades de este compuesto en fuentes de agua.

### **3.11) Herramientas estadísticas para la comparación de resultados.**

Evaluar como las condiciones experimentales influyen en cada método de extracción no es tarea sencilla, estas condiciones de forma individual pueden influir claramente hacia una dirección en los resultados del experimento, sin embargo la interacción simultanea de cada condición dan respuestas que no son del todo claras. Para solucionar este inconveniente se puede aplicar una herramienta estadística denominada diseño de análisis factorial o simplemente diseño factorial.



---

---

### 3.11.1) Diseño de experimento por análisis factorial.

El diseño factorial es uno de los diseños experimentales más empleados para establecer efectos de diferentes variables sobre la respuesta del sistema. En un diseño factorial los efectos de un número de variables experimentales (llamadas factores) son investigados simultáneamente. Las experiencias consisten en todas las posibles combinaciones de los niveles de los diferentes factores, entendiéndose por niveles los valores que toman las diferentes variables. En muchas técnicas analíticas la respuesta del sistema de medida depende de una variedad de factores experimentales bajo el control del operador, será necesario pues establecer cuáles son los niveles óptimos para cada factor este proceso se conoce como optimización. La efectividad de este diseño radica en que todas las observaciones dan información sobre todos los factores en el experimento, y además permite determinar si hay interacción entre factores, evitando así conclusiones erróneas [43].

En este estudio se emplea el diseño de análisis factorial como una herramienta para determinar los factores que afectan significativamente los métodos de extracción, y así establecer cuáles son las condiciones experimentales óptimas para la extracción de cada pesticida. Para este estudio hay tres factores a evaluar: tiempo, temperatura y concentración añadida. Cada factor puede tomar dos valores por tanto hay dos niveles para cada factor.

### 3.12) Límites máximos residuales.

Los límites máximos residuales (LMR) son las máximas cantidades de algún pesticida que pueden ser encontrados en una matriz determinada los LMR pueden variar de acuerdo a la legislación que se tome en cuenta y esta depende directamente del área geográfica de estudio, a continuación se presenta una tabla donde se especifican los límites máximos residuales para los pesticidas estudiados en fresas, la



matriz estudiada. Los LMR aquí presentados son se clasifican según tres normativas: el codex alimentarius normativa de la FAO [44], la norma estadounidense establecida por la Enviromental Protection Agency (EPA) [45] y la europea establecida por la Union Europea (UE) [46].

**Tabla 9:** Límites Máximos Residuales para los compuestos estudiados en fresas.

<b>Compuesto</b>	<b>Codex Alimentarius (mg/Kg)</b>	<b>Norma EPA (mg/Kg)</b>	<b>Norma UE (mg/Kg)</b>
<b>Metilparation</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>0,02</b>
<b>Heptacloro</b>	<b>0,2</b>	<b>1</b>	<b>0,01</b>
<b>Malation</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>0,02</b>
<b>Aldrin</b>	<b>0,2</b>	<b>1</b>	<b>0,01</b>

### **3.13) Legislación y normativa relacionada con el empleo de pesticidas en la República Bolivariana de Venezuela.**

La manipulación de pesticidas puede ocasionar daños ecológicos, ambientales, sociales y de salud a los seres humanos, por lo que se ha establecido un marco legal bastante amplio en lo que respecta al empleo de este tipo de productos a nivel mundial. Organismos internacionales como la FAO y la OMS han establecidos criterios para restringir el uso y aplicación de pesticidas, de allí nacen la regulación internacional bajo la figura de convenios los cuales son de obligatorio cumplimiento para los países signatarios. Así mismo se ha establecido normativas a nivel nacional con el fin de particularizar la regulación al territorio venezolano. A continuación se listan la normativa tanto internacional como Nacional que debe cumplir la República Bolivariana de



---

---

Venezuela en el marco de producción comercialización, utilización y disposición de pesticidas [47].

### 3.13.1) Legislación internacional.

Los convenios internacionales relativos a sustancias químicas peligrosas forman parte de la legislación venezolana bajo la figura de ley aprobatoria [56], los convenios internacionales cuya suscripción sigue vigente por parte de la Republica Bolivariana de Venezuela son:

**Codex Alimentarius:** y más específicamente el Comité del Codex sobre Residuos de Plaguicidas, es una guía sobre el manejo de pesticidas establecida por la FAO y la OMS para el cumplimiento de los países signatarios.

**Protocolo de Montreal:** relativo a las sustancias que agotan la capa de ozono Venezuela se adhirió al protocolo en 1987 pero entró en vigor en 1989.

**Convenio de Rotterdam:** “sobre el Procedimiento de Consentimiento Fundamentales Previo a Ciertos Plaguicidas y Productos Químicos Peligrosos Objeto de Comercio Internacional”, Ratificado por la República de Venezuela bajo la figura de Ley aprobatoria desde el 06 de mayo de 2004

**Convenio de Estocolmo:** relativo a los Contaminantes Orgánicos Persistentes es aprobado por Venezuela el 22 de julio de 2003.



---

---

**Convenio de Basilea:** sobre el Control de Movimientos Transfronterizos de los Desechos Peligrosos y su Eliminación. Aprobado el 22 de marzo de 1989, ONU. Gaceta Oficial de la República de Venezuela No. 36.396 del 16 de Febrero de 1998.

### 3.13.2) Legislación nacional.

**Constitución de la República Bolivariana de Venezuela:** Capítulo IX de los derechos ambientales -Artículo 129 - Todas las actividades susceptibles de generar daños a los ecosistemas deben ser previamente acompañadas de estudios de impacto ambiental y socio cultural. Gaceta Oficial de la República de Bolivariana de Venezuela No. 36.860 del 30 de Diciembre de 1999.

**Ley Orgánica del Ambiente:** “Tiene por objeto establecer las disposiciones y desarrollar los principios rectores para la gestión del ambiente en el marco del desarrollo sustentable como derecho y deber fundamental del Estado y de la sociedad, para contribuir a la seguridad del Estado y al logro del máximo bienestar de la población y al sostenimiento del planeta en interés de la humanidad”. De igual forma establece las normas que desarrollan las garantías y derechos constitucionales a un ambiente seguro, sano y ecológicamente equilibrado. Gaceta Oficial de la República de Bolivariana de Venezuela Extraordinaria No. 5.833 del 22 de Diciembre de 2006. (Deroga la Ley Orgánica del Ambiente publicada en Gaceta Oficial de la República de Venezuela No. 31.004 del 16 de Junio de 1976).

**Ley Penal del Ambiente:** Tiene por objeto tipificar como delitos, aquellos hechos que violen las disposiciones relativas a la conservación, defensa y mejoramiento del ambiente y establece las sanciones penales correspondientes. Asimismo, determina las



---

---

medidas precautelativas de restitución y de reparación a que haya lugar. Gaceta Oficial de la República de Venezuela No. 4.358 Extraordinario del 03 de Enero de 1992.

**Ley sobre Sustancias, Materiales y Desechos Peligrosos.** La Ley tiene por objeto establecer las normas para el uso, manejo, transporte y almacenamiento y la disposición final de las sustancias y desechos peligrosos que en ella se regulan, a fin de proteger el ambiente y la salud. Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela No. 5.554 Extraordinario del 13 de Noviembre de 2001.

**Ley de Salud Agrícola Integral:** tiene por objeto garantizar la salud agrícola integral. Se entiende por salud agrícola integral la salud primaria de animales, vegetales, productos y subproductos de ambos orígenes, suelo, aguas, aire, personas y la estrecha relación entre cada uno de ellos, incorporando principios de la ciencia agroecológica que promuevan la seguridad y soberanía alimentaria, y la participación popular, a través de la formulación, ejecución y control de políticas, planes y programas para la prevención, control y erradicación de plagas y enfermedades. Decreto N° 6.129, con Rango, Valor y Fuerza de Ley de Salud Agrícola Integral. Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela 31 de julio de 2008

**Decreto Presidencial N° 1.847 Reglamento General de Plaguicidas:** Este reglamento es la norma específica venezolana vigente en materia de plaguicidas, está constituido por cuarenta y tres artículos organizados en siete capítulos y tiene por objeto la regulación, el control y la vigilancia en la fabricación, formulación, comercialización y utilización de los plaguicidas, de acuerdo a las normas establecidas por los organismos competentes. Gaceta Oficial de la República de Venezuela No. 34.877 del 08 de Enero de 1992.



---

---

**Normas sobre Evaluación Ambiental de Actividades Susceptibles de Degradar el Ambiente:** Decreto No. 1.257 de fecha 13-03-96, Gaceta Oficial de la República de Venezuela No. 35.946 del 25 de Abril de 1996. (Se deroga el Decreto No. 2.213 de fecha 24-04-92, publicado en la Gaceta Oficial de la República de Venezuela No. 4.418 Extraordinario del 27 de Abril de 1992).

**Normas de la Comisión Venezolana de Normas Industriales COVENIN:**

Norma 1106:1995 sobre clasificación de plaguicidas

Norma 965-82 sobre definición de plaguicidas.

Norma 2846-93 Evaluación toxicológica de plaguicidas.

A pesar de todas las leyes convenios y decretos que existen fuentes periodísticas y científicas exponen que en Venezuela se emplean pesticidas restringidos y que sus residuos están presentes en alimentos de consumo humano sin ninguna regulación [54]



---

---

#### 4) ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Diversas son las determinaciones de pesticidas que se han llevado a cabo en distintas matrices empleando diferentes métodos de extracción y análisis. A continuación se detallan las investigaciones que tienen mayor relevancia con el presente trabajo de investigación.

##### 4.1) Antecedentes Internacionales.

**Pylypiw y cols. (1997) [48]:** Estudiaron la viabilidad de la aplicación de la técnica de extracción asistida por microondas para la determinación de residuos de siete pesticidas (Dactal, Clorpirifos, Chlorothalonil, Diazinon, Permethrin, Metoxychlor y Azinfos metilo) en distintas matrices de alimentos como tomate y lechuga provenientes de cultivos locales de Connecticut en Estados Unidos, compararon estos resultados con el método de extracción Blender el cual consiste en agitar la muestra con un solvente de extracción. Como resultado se encontró que la MAE tiene dependencia directa tanto de la matriz como de los pesticidas que se están analizando, por lo que sugirieron que debe haber una optimización individual dependiendo de la matriz y del pesticida analizado.

**Annastasiadess y cols. (2003) [38]:** Anasstasiadess y su equipo internacional lograron establecer un método para el análisis multiresidual de pesticidas, como resultado de una ardua investigación para evitar los inconvenientes que surgen cuando una misma matriz posee varios compuestos, el mismo resultó ser sencillo y efectivo en comparación con otros de la época. Al método lo denominaron QuEChERS que resulta de las palabras en inglés Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe, que significan: fácil, barato, efectivo, robusto y seguro. Para ello evaluaron un amplio rango de pesticidas incluyendo compuestos muy polares y otros básicos como Metamidofos, Acefato, Metoato, Imazil y Tiabendazol los cuales fueron extraídos de matrices de frutos y vegetales. Lograron porcentajes de recuperación que variaron entre un 85% y un 101% y un coeficiente de varianza menor a 5%.



---

---

**Lethotay y cols. (2005) [49]:** Validaron un método para la determinación de 229 pesticidas usando como técnicas de análisis la cromatografía de gases con espectrometría de masas y la cromatografía de líquidos espectrometría de masas para el instituto Holandés de alimentos. Se empleó como matriz muestras de lechuga y naranjas contaminadas en un rango de 10-100ng/g de cada pesticida y como método de extracción el método QuEChERS con modificaciones al método original. Para cuantificar emplearon como estándar interno trifenilfosfato y Etoprofos. Se obtuvo un porcentaje de recuperación entre 70 y 110% para la mayoría de los analitos y en términos de reproducibilidad se obtuvo un Coeficiente de variación (CV) <10%.

**Plaza y cols. (2007) [50]:** Diseñaron un método para validar la determinación simultánea de 151 residuos de pesticidas en fresas las cuales fueron adquiridas en supermercados de la ciudad de Almería España, para ello emplearon la técnica de cromatografía de gases con detector de masas de triple cuadrupolo, la detección incluyó pesticidas del tipo organoclorados, organofosforados, carbamatos piretoides, triazoles y dicarboximidias. Para llevar a cabo el estudio se empleó el método de extracción QuEChERS obteniendo porcentajes de recuperación que variaron entre 70 y 110% y la precisión expresada como CV fue menor de 18% para todos los compuestos, la linealidad fue estudiada en el rango de 10 – 200 µg/Kg obteniendose coeficientes de correlación  $R^2$  mayor a 0,98 en todos los casos y los valores de LOD y LOQ fueron 4 µg/Kg y 10 µg/Kg, respectivamente. Concluyeron que tanto las características del método y los resultados obtenidos lo hacían útil para determinaciones de rutina de residuos de pesticidas en el laboratorio.

**Tan y Chai (2010) [51]:** Estos investigadores Malasios establecieron parámetros específicos para el tratamiento de muestras de alimentos, para determinar pesticidas a nivel de residuos empleando técnicas cromatográficas, que generen resultados reproducibles y exactos. Para ello estudiaron distintas técnicas de extracción como la



---

---

líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME), dispersión en fase sólida de matriz (MSPD), microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME), extracción absorbente de agitador magnético (SBSE), microextracción en gota (SDME), extracción de Fluidos presurizados (PFE), extracción asistida por microondas (MAE) y extracción de fluidos supercríticos (SFE). Los resultados obtenidos fueron mejores para las distintas extracciones en fase sólida en términos de recuperación de analito, límites de detección y límites de cuantificación. Les siguieron las técnicas MAE y SFE en último lugar se ubicaron las demás técnicas.

#### 4.2) Antecedentes Nacionales.

**Izquierdo y cols. (2004) [52]:** Estos investigadores de la Universidad del Zulia estudiaron la presencia de residuos organoclorados en formulas infantiles de marca nacional e internacional a través de la técnica de cromatografía de gases con detector de captura de electrones ECD. Encontraron que el residuo más frecuente fue de Endrin el cual estaba presente en un 55% de las muestras, les seguían el DDT (37,5%), Heptacloro (35%), Aldrín (30%), Lindano (25%) y en menor frecuencia se encontró el Clordano 7,5%. También especifican que todas las muestras de carácter nacional sobrepasaron los límites máximos residuales establecidos por la FAO y la OMS excepto para los pesticidas DDT y BHC, mientras que en las muestras importadas superaron los límites los pesticidas Lindano, Dieldrin, Endrin y Heptacloro.

**Pierre y Betancourt (2007) [53]:** Evaluaron el manejo de pesticidas y la acumulación de residuos organoclorados y organofosforados en cebollas provenientes del Valle de Quíbor en el estado Lara. Emplearon para la determinación cromatografía de gases con detector de capturas de electrones (EDC) para los pesticidas organoclorados y detector fotométrico de llama (FDP) para los organofosforados. Encontraron que la mayoría de los residuos pertenecían a la familia de los organofosforados, les seguía los organoclorados y los carbamatos, obteniendo niveles superiores a los establecidos en



---

---

la normativa internacional para los pesticidas Clorpirifos (hasta 0,02 mg/Kg) y Butacloro (hasta 1,86 mg/Kg). Aunque en este trabajo no se evaluaron parámetros analíticos como LOD, LOQ o porcentajes de recuperación, los autores concluyeron que, si bien se encontraron residuos de los pesticidas todos salvo los dos anteriores se encontraban en concentraciones seguras establecidas por la FAO y la EPA y que existe una relación directa entre el uso inadecuado de los pesticidas y la acumulación de sus residuos en el cultivo de cebolla.

**Ettiene y cols. (2008) [54]:** Optimizaron y validaron un método analítico para la extracción y limpieza de residuos de insecticidas organofosforados (Diazinón, Malatión, Paratión, Disulfotón, Fenitrotión, Fenclorfos, Clorfenvinfos, y Metidatión) en cebollín (*Allium fistulosum* L.) y cilantro (*Coriandrum sativum* L.) provenientes de supermercados de la ciudad de Maracaibo estado Zulia. La cuantificación se realizó empleando cromatografía de gases capilar (CGC) con detector selectivo nitrógeno- fósforo NPD y la purificación con extracción en fase sólida. Calcularon los porcentajes de recuperación para cada compuesto evaluando la eficiencia del método. Condicionaron 4g de muestra de cada matriz, libre de residuos de insecticidas, una concentración conocida de los compuestos organofosforados (0,2-10  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). La fase sólida carbón activado/florisil (200:700mg), permitió la obtención de altos porcentajes de recuperación (96-105%) y extractos limpios. El método de extracción propuesto mostró una alta precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad (RSD <3%) y bajos límites de detección (0,0061-0,020  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Concluyeron que el método cumplió los objetivos planteados en la etapa de extracción y limpieza ya que se obtuvo óptimos porcentajes de recuperación para todos los compuestos en las dos matrices evaluadas.

En los antecedentes descritos anteriormente se puede apreciar que la determinación de pesticidas se lleva a cabo exclusivamente en diversas matrices de alimentos, esto se desprende de la preocupación cada vez más acentuada por parte de

los consumidores de acceder a alimentos confiables y libres de compuestos tóxicos. Los métodos de extracción empleados son numerosos sin embargo en todos los casos se recurrió a técnicas de cromatografía de gases (GC) y cromatografía líquida (HPLC) acoplado a diversos detectores, estas técnicas proveen un análisis confiable inclusive a niveles trazas, lo que es común en residuos de pesticidas en alimentos. La variedad de pesticidas que estudiaron estos investigadores fue amplia sin embargo se nota la recurrencia de ciertos pesticidas como el DDT, Aldrín, Malatión, Paratión, BHC entre otros. Los resultados de precisión y exactitud que se obtuvieron dependen en gran medida, de los procesos aplicados en el tratamiento de la muestra lo cual se asocia a los distintos tipos de matrices. La tabla 10 muestra un resumen para los antecedentes descritos.

**Tabla 10:** Resumen de las investigaciones expuestas en los antecedentes a la investigación.

Antecedente	Tipo de Muestra	Método de extracción	Técnica de Análisis	Resultados
<i>Pylypiw y cols.</i>	Tomate y lechuga	Blender Y MAE	GC-ECD	MAE mejor que Blender, los parámetros de MAE se deben optimizar individualmente para cada pesticida
<i>Annastasiadess y cols.</i>	Diversas frutas y vegetales	QuEChERS	GC-MS	Recuperación entre 85-110%, CV<5%
<i>Lethotay y cols.</i>	Lechuga y Naranjas	QuEChERS	GC-MS y HPLC-MS	Recuperación entre 70-110%, CV<10%
<i>Plaza y cols.</i>	Fresas	QuEChERS	GC-MS	Recuperación entre 70-110%, CV<18%
<i>Tan y Chai</i>	Diversos alimentos	MAE SPE y otros	GC y HPLC con diversos detectores	SPE mejor que MAE y esta mejor que las demás
<i>Izquierdo y cols.</i>	Formulas infantiles	LLE	GC-ECD	Presencia de los pesticidas DDT, Aldrín, Heptacloro, Lindano y Clordano
<i>Pierre y Betancourt</i>	Cebollas	LLE	GC-ECD y GC-FDP	Solo los pesticidas Clorpirifos y Butacloro estaban por encima de los límites de la FAOy EPA
<i>Ettiene y col.</i>	Cebollín y Cilantro	SPE	CGC-NPD	Recuperación entre 96-105%, CV<18%



---

---

## 5) OBJETIVOS

### 5.1) Objetivo general:

Comparar los métodos de extracción QUECHERS y extracción asistida por microondas (MAE) en términos de calidad de los parámetros analíticos para la determinación de pesticidas organoclorados y organofosforados en fresas, empleando como técnica de detección la cromatografía de gases con espectrometría de masas.

### 5.2) Objetivos específicos:

- ✓ Obtener una muestra representativa para el estudio.
- ✓ Evaluar parámetros analíticos como rango lineal, rango dinámico, límites de detección, límites de cuantificación y sensibilidad de la técnica empleada.
- ✓ Optimizar las variables analíticas de los métodos de extracción propuestos.
- ✓ Comparar ambos métodos de extracción en términos de precisión y exactitud para la determinación de los pesticidas de interés.
- ✓ Identificar si hay presencia de los pesticidas estudiados en la muestra de fresas.



---

---

## 6) METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 6.1) Instrumentación y accesorios.

#### 6.1.1) Instrumentación.

- Para la extracción asistida por microondas se uso un equipo de radiación microondas marca CEM modelo Mars5 de control programable y con potencia máxima de 1200Watts.
- Para el análisis de las muestras se empleo un cromatógrafo de gases con detección de masas marca Agilent Technologies ® modelo 7890A.
- La columna empleada en el cromatógrafo fue una columna capilar marca Agilent Technologies ® catalogo 190915-433 HP-SMS longitud 30m diámetro 0,25mm recubrimiento 0,25µm.
- La separación cromatográfica fue llevada a cabo bajo los siguientes parámetros experimentales.

Temperatura del inyector: 250°C

Tiempo total de corrida: 23,7min

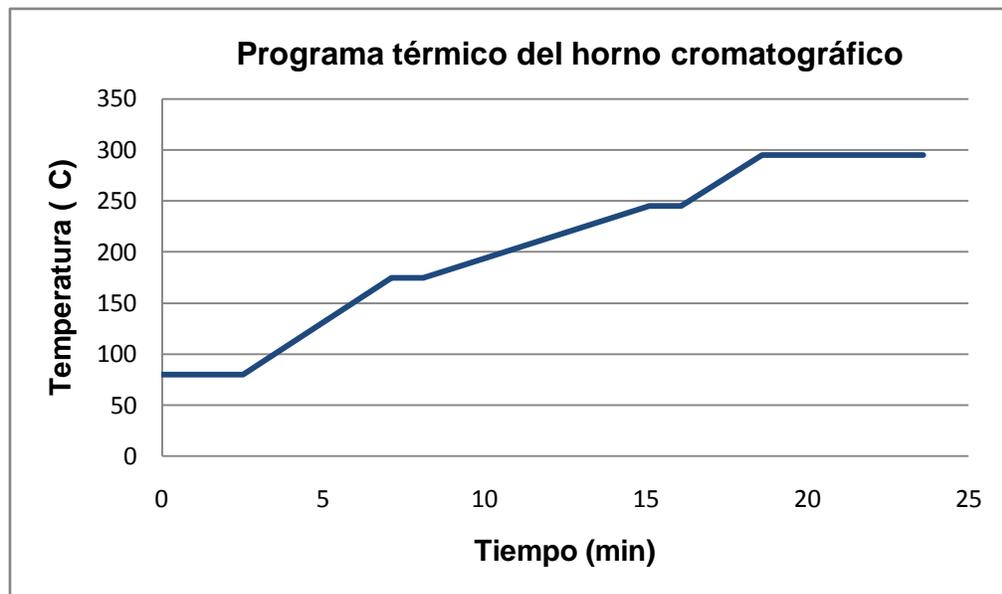
Volumen de Inyección: 1µL

El programa térmico utilizado para la separación de los diferentes pesticidas se muestra en la tabla 11

**Tabla 11:** Programa térmico del horno cromatográfico para la separación de los pesticidas.

Incremento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
0	80	2,50
20	175	1
10	245	1
20	295	5

En la figura 9 se muestra gráficamente el programa térmico antes mencionado para una mejor visualización



**Figura 9:** Programa térmico del horno cromatográfico para la separación de los pesticidas



- 
- 
- La detección se llevo a cabo empleando un detector de masas marca Agilent Technologies® modelo 5975C.
  - El cromatógrafo estaba provisto de un automuestreador acoplado al puerto de inyección marca Agilent Technologies® serie 7683B.

### **6.1.2) Accesorios.**

- Rotaevaporador marca Büchi modelo convencional.
- Para eliminar interferentes y otros componentes se empleó cartuchos de extracción en fase sólida  $C_{18}$  marca Waters Associates® modelo SEP-PAK.
- Para la extracción QuEChERS se emplearon cartuchos de extracción en fase solida de amina primaria secundaria marca Agilent technologies® Bond Elut PSA 500mg.
- El sistema de adquisición de datos fue el software llamado MSD ChemStation 61701EA versión E 02.00.493.
- La biblioteca de espectros de masa utilizada fue la Nist MS search versión 2.0.
- El programa de tratamiento de datos para el diseño estadístico empleado fue el Statgraphic® versión 16.2 de Microsoft Inc. Corporation® [55] y para las pruebas estadísticas de contrastes de significación y parámetros de



---

---

calidad analítica fue el Excell 2010 Microsoft Office de Microsoft Inc. Corporation ®.

## 6.2) Reactivos.

- Los estándares de pesticidas empleados eran de la empresa Polyscience Corporation Niles, Illinois USA, de alta pureza.
- NaCl grado analítico de Merck Corporation.
- MgSO<sub>4</sub> anhidro grado analítico J.T Baker Chemical Co. Phillisbug USA.
- Acetonitrilo grado HPLC J.T Baker Chemical Co. Phillisburg USA.
- Tolueno grado HPLC Sigma-Aldrich.

## 6.3) Tratamiento de muestra.

Se trabajó con dos tipos de muestras, el primer tipo corresponde a una muestra denominada muestra general la cual fue suministrada por los productores del área de muestreo, esta muestra tuvo un peso de aproximadamente 600 gramos y fue empleada para realizar los estudios de recuperación a través de la adición controlada de pesticidas. El segundo tipo de muestra fue obtenida a través de la normativa codex alimentarius en el área de muestreo y es denominada muestra representativa, a esta muestra se le aplicó la condición óptima de la extracción asistida por microondas y la extracción QuEChERS con el objeto de determinar los pesticidas presentes en la zona muestreada.



### 6.3.1) Muestreo según normativa *codex alimentarius*.

Se llevó a cabo la captación representativa de muestras que fueron expuestas a la aplicación de pesticidas en campo, previo a su análisis. El proceso de captación y preservación de las muestras de fresas fue realizado según lo establecido en el *codex alimentarius* [22] con el objeto de obtener una muestra representativa de un lote en particular. Como precaución se evitó la contaminación y el deterioro de las muestras en todas las fases de muestreo para así evitar afectar los resultados analíticos, adicionalmente los envases para la recolección de los frutos fueron de vidrio ya que el plástico y otros polímeros interfieren con los pesticidas además de ser de color ámbar para evitar la degradación de algunos pesticidas vía fotoquímica, finalmente las muestras fueron congeladas para su preservación.

A continuación se muestra una tabla con las características bajo las cuales fue obtenida la muestra representativa.

**Tabla 12:** Condiciones y características del muestreo realizado por la normativa *codex alimentarius*.

<b>Fecha y hora</b>	05/01/2013 12:05pm
<b>Identificación y dimensión del lote</b>	Único 103x75m
<b>Condiciones Climáticas</b>	Soleado 23°C
<b>Número de unidades de fresas</b>	36
<b>Peso aproximado</b>	1,5Kg
<b>Observaciones</b>	La última fumigación se llevó a cabo tres días antes del muestreo con Aldebran® y Malafor®



### **6.3.2) Homogenización y almacenamiento.**

La muestra fue triturada en conjunto con un mortero de cerámica para homogeneizarla, posteriormente fue transferida a un envase de vidrio y congelada a una temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$  y se mantuvo guardada bajo estas condiciones hasta el momento de su análisis. Para el estudio se toman porciones de la muestra homogenizada y se les aplica los procesos de extracción que van a ser evaluados. Este tratamiento inicial fue aplicado tanto para la muestra general como para la muestra representativa.

### **6.4) Preparación de patrones y curvas de calibración.**

A partir de los estándares de pesticidas se prepararon soluciones patrones de cada uno de ellos a concentraciones de: 1, 5, 10, 15, 20 y 25 mg/L, adicionalmente se agregó el compuesto Phorate como estándar interno a una concentración constante de 10 mg/L para cada uno de estos patrones. Estos patrones se inyectaron en el cromatógrafo de gases y con los datos obtenidos se construyó la curva de calibración externa y la curva de estándar interno para cada pesticida analizado.

### **6.5) Métodos de extracción.**

En base a los objetivos propuestos para este trabajo se evaluó la efectividad entre los métodos de extracción QuEChERS y asistida por microondas (MAE) para la determinación de residuos de pesticidas en fresas. Para ello se siguieron los siguientes procedimientos experimentales.



### 6.5.1) Método de extracción asistida por microondas (MAE).

Para llevar a cabo el proceso de extracción, las muestras fueron pesadas directamente en los envases para extracción por microondas, se les añadió los pesticidas evaluados a concentraciones conocidas y se esperó dos horas para que la matriz los incorporase en su medio. Posteriormente se añadió el solvente de extracción (acetónitrilo), los envases fueron transferidos al equipo de microondas y se le aplicó una potencia de radiación de 400W bajo distintas condiciones según el diseño de experimento que se explica a continuación.

#### 6.5.1.1) Condiciones optimas de extracción MAE.

Con el objeto de determinar el efecto de las diferentes variables estudiadas sobre la recuperación de los pesticidas evaluados se empleó un diseño factorial  $2^n$  donde n es el número de factores o variables estudiadas y 2 es el número de valores que toman estas variables. En la siguiente tabla se muestran los factores y niveles estudiados.

**Tabla 13:** Factores y niveles del diseño de experimento utilizado.

<b>Factores:</b>	<b>Nivel -</b>	<b>Nivel +</b>
<b>A:</b> Tiempo (min)	5	10
<b>B:</b> Temperatura (°C)	40	60
<b>C:</b> Concentración (mg/Kg)	50	100

En base a la información de la tabla anterior se plantea todas las posibles combinaciones experimentales, lo cual da lugar a 8 condiciones distintas con una réplica por cada experimento esto da lugar a 16 experiencias en total cuyo diseño experimental se muestra detalladamente en la tabla 14.

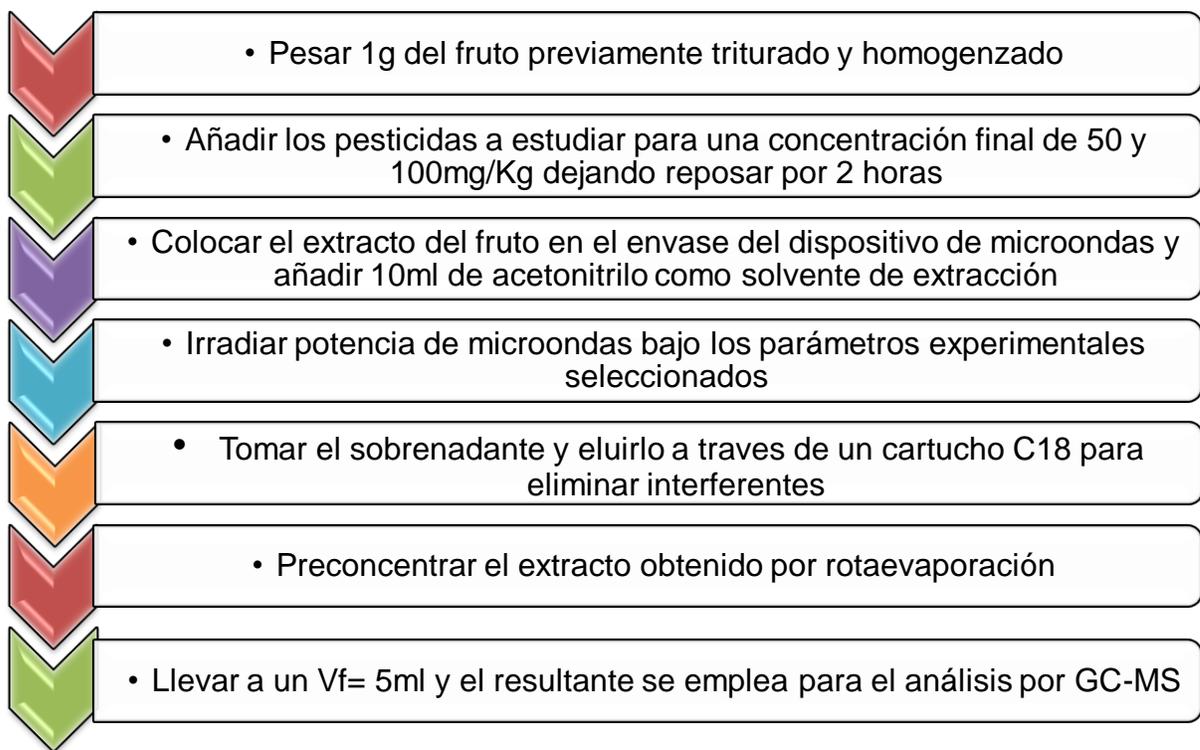
**Tabla 14:** Diseño experimental empleado para optimizar las condiciones experimentales en el equipo de radiación microondas.

<b>Experimento</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>1</b>	+	+	-
<b>2</b>	-	+	-
<b>3</b>	+	-	-
<b>4</b>	-	-	-
<b>5</b>	+	+	+
<b>6</b>	-	+	+
<b>7</b>	+	-	+
<b>8</b>	-	-	+
<b>9</b>	+	+	-
<b>10</b>	-	+	-
<b>11</b>	+	-	-
<b>12</b>	-	-	-
<b>13</b>	+	+	+
<b>14</b>	-	+	+
<b>15</b>	+	-	+
<b>16</b>	-	-	+

Una vez concluido el proceso de extracción para cada experimento, se tomó el sobrenadante y se pasó a través de un cartucho de extracción en fase sólida C<sub>18</sub>, donde los pesticidas eluyen del cartucho quedando retenidos los componentes interferentes. El extracto obtenido se preconcentró a través de un rotaevaporador y finalmente se llevó a un volumen final de 5ml con tolueno.

A continuación se muestra un esquema del método de extracción asistida por microondas aplicado a las muestras, el proceso fue idéntico para cada condición de extracción evaluado.

## Proceso de extracción asistida por microondas



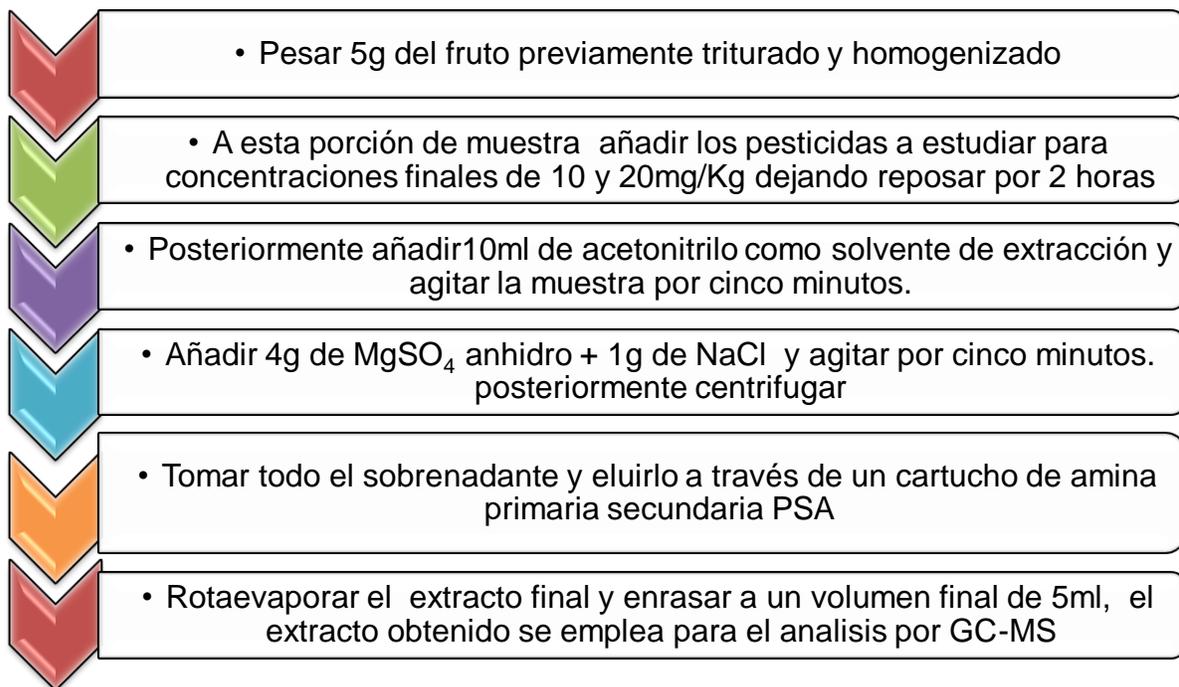
**Figura 10:** Esquema del proceso de extracción asistida por microondas.

### 6.5.2) Método de extracción QuEChERS:

Para llevar a cabo el método QuEChERS se pesó 5 gramos de muestra y se agregó 10ml de acetonitrilo como solvente de extracción, seguidamente se adicionó las sales cloruro sódico y sulfato magnésico para la parte de limpieza del extracto. Después de agitar la muestra, se centrifugó y una alícuota de la fase líquida se sometió a un

proceso de purificación empleando extracción en fase sólida dispersiva. En este caso, se pasó el extracto por un cartucho que contiene una pequeña cantidad de un adsorbente conocido como amina primaria-secundaria (PSA por sus siglas en inglés), se agitó y se centrifugó. El sobrenadante se concentró por rotaevaporación reconstituyendo en tolueno para su posterior análisis. En la figura 11 se muestra un esquema resumen del proceso de extracción QuEChERS aplicado.

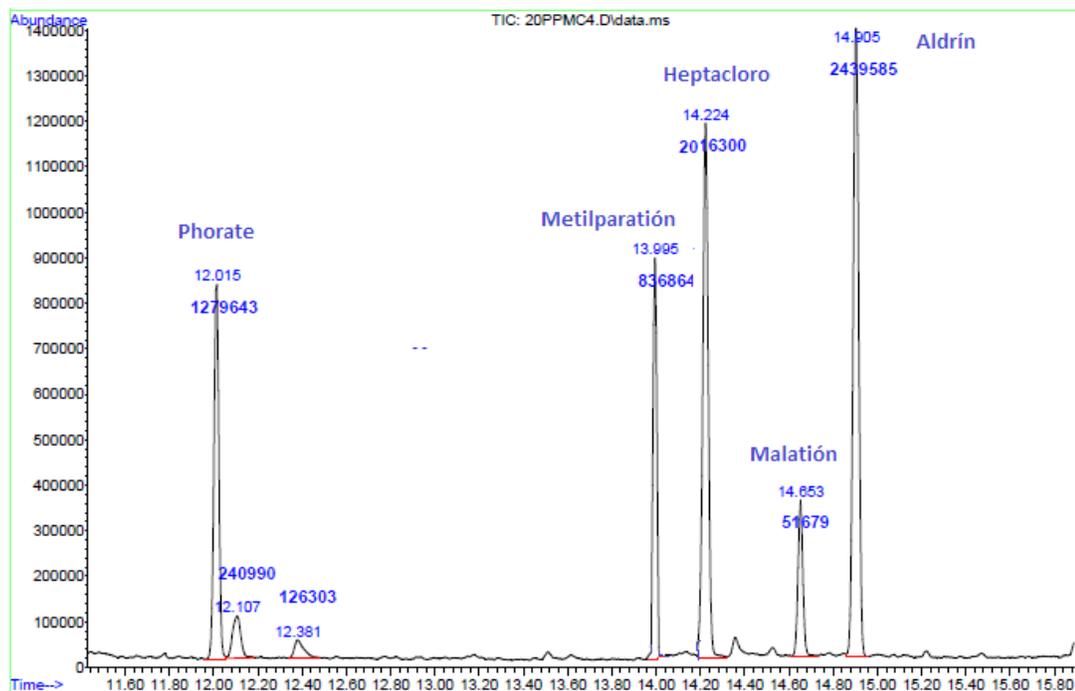
## Proceso de extracción QuEChERS



**Figura 11:** Esquema del proceso de extracción QuEChERS.

## 7) RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los patrones de pesticidas preparados fueron analizados bajo las condiciones cromatográficas especificadas en la tabla 11 con el objeto de establecer las condiciones de separación. En la figura 12 se muestra un cromatograma donde se observa el orden de elución de los diferentes pesticidas evaluados así como sus tiempos de retención. El compuesto Phorate fue empleado como estándar interno.



**Figura 12:** Orden de elución y tiempos de retención de los pesticidas estudiados.

Todos los componentes se resuelven bajo las condiciones de separación cromatográficas establecidas, la tabla 15 muestra los tiempos de retención promedios a los cuales eluyen los mismos.



**Tabla 15:** Tiempos de retención promedio para los pesticidas estudiados.

<b>Compuesto</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>
Phorate	12,015±0,003
Metilparatión	13,995±0,004
Heptacloro	14,224±0,003
Malatión	14,653±0,003
Aldrín	14,905±0,003

Aunque los tiempos de retención son cercanos entre sí, no hay superposición de los picos cromatográficos, por lo tanto se puede llevar a cabo el estudio.

### **7.1) Determinación del método de cuantificación:**

Para determinar cuál es el método de cuantificación idóneo para evaluar la concentración de pesticidas en las muestras se comparó estadísticamente los métodos de cuantificación por curvas de calibración externa y de estándar interno. Esta evaluación se realizó tanto para el método de extracción asistida por microondas como para el método de extracción QuEChERS para una concentración de pesticida agregado de 50mg/Kg y 10mg/Kg, respectivamente.

#### **7.1.1) Extracción asistida por microondas.**

En las tablas 16 y 17 se muestra los resultados para la determinación de concentración de pesticida agregado para las condiciones experimentales de temperatura y tiempo estudiados.



**Tabla 16:** Determinación en mg/Kg de los distintos pesticidas agregados, por el método de estándar interno.

Experimento	Metilparatión (mg/Kg)	Heptacloro (mg/Kg)	Malatión (mg/Kg)	Aldrín (mg/Kg)
1	0	34±4	0	29±4
2	41±2	34±3	25±2	28±3
3	0	32±2	0	27,2±0,6
4	34±4	27±4	0	21±3

En la tabla 17 se presenta los datos obtenidos por calibración externa, con los mismos datos experimentales que se emplearon para el cálculo de estándar interno.

**Tabla 17:** Determinación en mg/Kg de los distintos pesticidas agregados, por el método de calibración externa

Experimento	Metilparatión (mg/Kg)	Heptacloro (mg/Kg)	Malatión (mg/Kg)	Aldrín (mg/Kg)
1	0	44±1	0	43±3
2	44±1	43±2	40±1	41±1
3	0	43±4	0	42±5
4	36±4	33±3	0	30±2



Como se evidencia diferencias entre los valores obtenidos por estándar interno y calibración externa, se aplicaron pruebas estadísticas para determinar si las diferencias observadas entre estos métodos de cuantificación son significativas.

Primeramente se realizó una prueba F para comparar las varianzas de ambos métodos de cuantificación, esto sirve como base para una posterior comparación de medias donde se debe conocer si provienen de poblaciones con igual o distinta varianza, se establece como hipótesis nula  $H_0$  que no hay diferencias estadísticamente significativas en las varianzas de los dos métodos, la determinación se hizo a un nivel de confianza de 95% con una comparación del valor de F crítico a dos colas. La tabla 18 muestra los resultados obtenidos.

**Tabla 18:** Prueba F de Fisher para comparar las varianzas de los métodos de cuantificación calibración externa y estándar interno con la extracción asistida por microondas.

<b>Pesticida</b>	<b>Metilparatión</b>	<b>Heptacloro</b>	<b>Malatión</b>	<b>Aldrín</b>
<b>Media E.I</b>	41±2	34±3	25±2	28±3
<b>Media C.E</b>	44±1	43±2	40±1	41±1
<b>Varianza E.I</b>	4	9	4	9
<b>Varianza C.E</b>	1	4	1	1
<b>Estadístico F</b>	4	2,25	4	9
<b>F crítico (95% de confianza)</b>	647,8	647,8	647,8	647,8
<b>Resultado</b>	$F_{exp} < F_{cri}$	$F_{exp} < F_{cri}$	$F_{exp} < F_{cri}$	$F_{exp} < F_{cri}$
<b>Conclusión</b>	Se acepta $H_0$	Se acepta $H_0$	Se acepta $H_0$	Se acepta $H_0$

Como se puede observar en la tabla anterior los valores de varianzas de ambos métodos de análisis son estadísticamente iguales ya que  $F_{exp} < F_{cri}$ .

Seguidamente se realizó una comparación de los valores de las medias con el fin de observar si hay diferencias entre ellas, para ello se aplica una prueba t de student para varianzas iguales. Se establece como hipótesis nula que no hay diferencias



estadísticamente significativas entre los valores de las medias de ambos métodos de análisis, nuevamente la determinación se hizo a un nivel de confianza de 95%. La tabla 19 muestra los resultados obtenidos.

**Tabla 19:** Prueba t de Student para comparar las medias de los métodos de cuantificación por calibración externa y estándar interno con la extracción asistida por microondas.

<b>Pesticida</b>	<b>Metilparatión</b>	<b>Heptacloro</b>	<b>Malatión</b>	<b>Aldrín</b>
<b>Media E.I</b>	41±2	34±3	25±2	28±3
<b>Media C.E</b>	44±1	43±2	40±1	41±1
<b>Varianza E.I</b>	4	9	4	9
<b>Varianza C.E</b>	1	4	1	1
<b>Estadístico  t </b>	2,37	3,60	9,00	6,20
<b>t crítico (95% de confianza)</b>	4,30	4,30	4,30	4,30
<b>Resultado</b>	$t_{exp} < t_{cri}$	$t_{exp} < t_{cri}$	$t_{exp} > t_{cri}$	$t_{exp} > t_{cri}$
<b>Conclusión</b>	Se acepta $H_0$	Se acepta $H_0$	Se rechaza $H_0$	Se rechaza $H_0$

Los resultados de la tabla anterior muestra que los pesticidas donde las medias son estadísticamente iguales son el Metilparatión y el Heptacloro, para los demás pesticidas se rechaza la hipótesis nula y por tanto no es igual cuantificar por estándar interno que por calibración externa. De ambos métodos de análisis la curva de calibración externa es la que da lugar a valores de concentración mas cercanos al valor real (50mg/kg) por tanto este es el método de cuantificación seleccionado para la extracción asistida por microondas.



### 7.1.2) Extracción QuEChERS.

La tabla 20 muestra los resultados de concentración de pesticida agregado para el proceso de extracción QuEChERS.

**Tabla 20:** Determinación en mg/Kg de los distintos pesticidas agregados, por los métodos de cuantificación evaluados para el método QuEChERS.

Pesticida	Estandar interno (mg/Kg)	Calibración Externa (mg/Kg)
Metilparatión	7,9±0,7	8,1±0,7
Heptacloro	5,5±0,4	7,5±0,3
Malatión	4,0±1,0	6,2±0,4
Aldrín	5,8±0,2	8,5±0,1

La tabla 21 muestra los resultados de la prueba estadística F de Fisher para los métodos de cuantificación evaluados.

**Tabla 21:** Prueba F de Fisher para comparar las varianzas de los métodos de cuantificación por calibración externa y estándar interno con el método de extracción QuEChERS.

Pesticida	Metilparatión	Heptacloro	Malatión	Aldrín
Media E.I	7,9±0,7	5,5±0,4	4,0±1,0	5,8±0,2
Media C.E	8,1±0,7	7,5±0,3	6,2±0,4	8,5±0,1
Varianza E.I	0,49	0,16	1	0,04
Varianza C.E	0,49	0,09	0,16	0,01
Estadístico F	1,00	3,16	1,00	4
F crítico (95% de confianza)	799,5	799,5	799,5	799,5
Resultado	Fcal<Fcri	Fcal<Fcri	Fcal<Fcri	Fcal<Fcri
Conclusión	Se acepta H <sub>0</sub>			

Puede observarse que las varianzas de ambos métodos de análisis son iguales, en todos los casos se acepta la hipótesis nula. Seguidamente se realizó una comparación de medias a través de la prueba t de Student a un nivel de confianza de 95% con varianzas iguales.

**Tabla 22:** Prueba t de Student para comparar las medias de los métodos de cuantificación por calibración externa y estándar interno con el método de extracción QuEChERS.

Pesticida	Metilparatión	Heptacloro	Malatión	Aldrín
<b>Media E.I</b>	7,9±0,7	5,5±0,4	4±1	5,8±0,4
<b>Media C.E</b>	8,1±0,7	7,5±0,3	6,2±0,4	8,5±0,1
<b>Varianza E.I</b>	0,49	0,16	1	0,17
<b>Varianza C.E</b>	0,49	0,09	0,16	0,01
<b>Estadístico  t </b>	0,21	7,08	10,01	10,64
<b>t crítico (95% de confianza)</b>	2,78	2,78	2,78	2,78
<b>Resultado</b>	texp<tcri	texp>tcri	texp>tcri	texp>tcri
<b>Conclusión</b>	Se acepta H <sub>0</sub>	Se rechaza H <sub>0</sub>	Se rechaza H <sub>0</sub>	Se rechaza H <sub>0</sub>

Se observa que el pesticida Metilparatión es el único que presenta medias estadísticamente iguales por los dos métodos de cuantificación, para el resto de los pesticidas se rechaza la hipótesis nula y por tanto no es igual cuantificar por estándar interno o por calibración externa. En similitud con el caso anterior el método de calibración externa es el que da lugar a valores de concentración cercanas al valor real por tanto es el método seleccionado para la cuantificación.

El método de estándar interno tiene la ventaja de compensar los errores asociados a la incertidumbre de inyección por cromatografía de gases, sin embargo en esta investigación se cuenta con un automuestreador computarizado lo cual descarta



---

---

este inconveniente. Debido a que los datos de ambos métodos de cuantificación son idénticos y solo difiere la forma en que fueron tratados los mismos, las discrepancias en los valores se pueden atribuir al comportamiento que tuvo el compuesto Phorate dentro del sistema; este fue usado como estándar interno y se presume que el mismo no actuó adecuadamente. En base a lo anteriormente expuesto todos los análisis se harán en base al método de cuantificación por curva de calibración externa.

## 7.2) Parámetros de calidad analítica instrumental

A partir de la curva de calibración externa se determinó para cada pesticida: el límite de detección (LOD por sus siglas en inglés) que es la cantidad mínima detectable por el equipo a un nivel de confianza dado, en este caso  $3\sigma$ , el límite de cuantificación (LOQ por sus siglas en inglés) o la cantidad mínima cuantificable a un nivel de confianza dado  $10\sigma$ , adicionalmente se estableció hasta donde la detección seguía un modelo lineal o el límite de linealidad (LOL por sus siglas en inglés), con ello se estableció el rango de trabajo lineal que va desde el valor de LOQ hasta el LOL y el rango dinámico que va desde LOD hasta donde se pierde la relación respuesta-concentración, finalmente se calculó el inverso de la sensibilidad analítica que es la mínima concentración diferenciable para cada compuesto estudiado. La tabla 23 ubicada a continuación muestra los resultados para cada parámetro.



**Tabla 23:** Parámetros de calidad analítica instrumental.

<b>Pesticida</b>	<b>Metilparatión</b>	<b>Heptacloro</b>	<b>Malatión</b>	<b>Aldrín</b>
<b>Ecuación de la recta</b>	$y = 43855X + 42860$	$y = 97137X - 72040$	$y = 3311,1X - 4128,4$	$y = 148664x - 44356$
<b>Coefficiente R<sup>2</sup></b>	0,9986	0,9996	0,9988	0,9992
<b>LOD (mg/Kg)</b>	1,47	1,41	0,95	1,18
<b>LOQ (mg/Kg)</b>	4,90	4,70	1,56	3,94
<b>LOL (mg/Kg)</b>	152	135	103	123
<b>Rango Lineal</b>	(4,90-152)	(4,70-135)	(1,47-103)	(3,94-123)
<b>Rango Dinámico</b>	(1,47-856)	(1,41-832)	(0,95-798)	(1,18-807)
<b>Sensibilidad analítica<sup>-1</sup> (mg/Kg)</b>	1,20	0,56	1,63	0,18

Las curvas de calibración externa empleadas tienen coeficientes por ajustes de mínimos cuadrados R<sup>2</sup> que exhiben una buena distribución lineal, adicionalmente los valores de LOD y LOQ muestran la capacidad del equipo para detectar los analitos de interés y para cuantificar los mismos de manera fiable libre de errores de las desviaciones estándar originadas por la señal del blanco.

### **7.3) Evaluación de las condiciones óptimas para la extracción asistida por microondas según diseño de experimento.**

En la siguiente tabla se muestra los resultados de recuperación para los 4 pesticidas evaluados para todos los experimentos realizados según diseño de experimento 2<sup>3</sup> con réplica. Para llevar a cabo la evaluación del diseño se empleó el software estadístico Statgraphics® versión 16.2 [55].

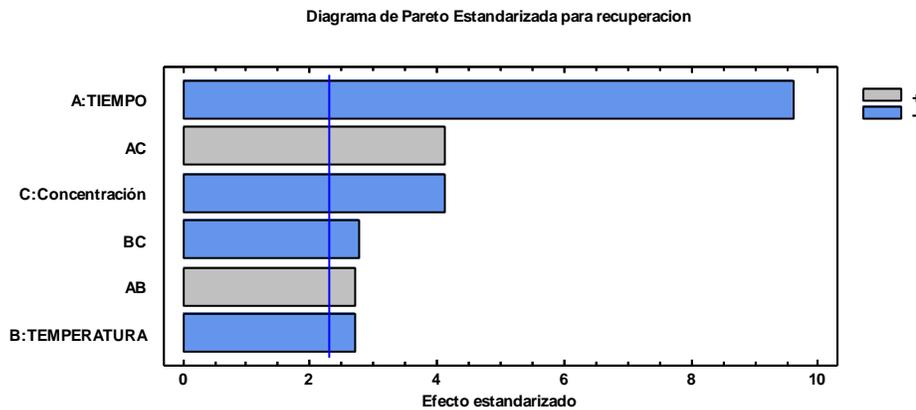


**Tabla 24:** Porcentajes de recuperación obtenidos con el diseño de experimento 2<sup>3</sup> para cada pesticida estudiado en la optimización del método de extracción asistida por microondas.

Experimento	A	B	C	Metilparatión	Heptacloro	Malatión	Aldrín
1	+	+	-	0	88,10	0	90,20
2	-	+	-	94,41	92,75	96,76	89,63
3	+	-	-	0	88,56	0	85,32
4	-	-	-	92,44	84,74	0	75,08
5	+	+	+	0	81,72	0	76,50
6	-	+	+	0	84,89	0	78,67
7	+	-	+	0	78,30	0	80,93
8	-	-	+	79,88	85,67	85,86	76,29
9	+	+	-	0	98,99	0	90,56
10	-	+	-	93,22	97,17	91,37	92,30
11	+	-	-	0	99,68	0	97,72
12	-	-	-	93,07	92,21	0	81,81
13	+	+	+	0	75,56	0	77,99
14	-	+	+	0	83,55	0	76,40
15	+	-	+	0	90,12	0	87,03
16	-	-	+	69,51	85,84	92,25	70,01

### 7.3.1) Análisis del diseño factorial para la recuperación de Metilparatión.

A continuación se presenta en la figura 13 el diagrama de Pareto para la recuperación del pesticida Metilparatión

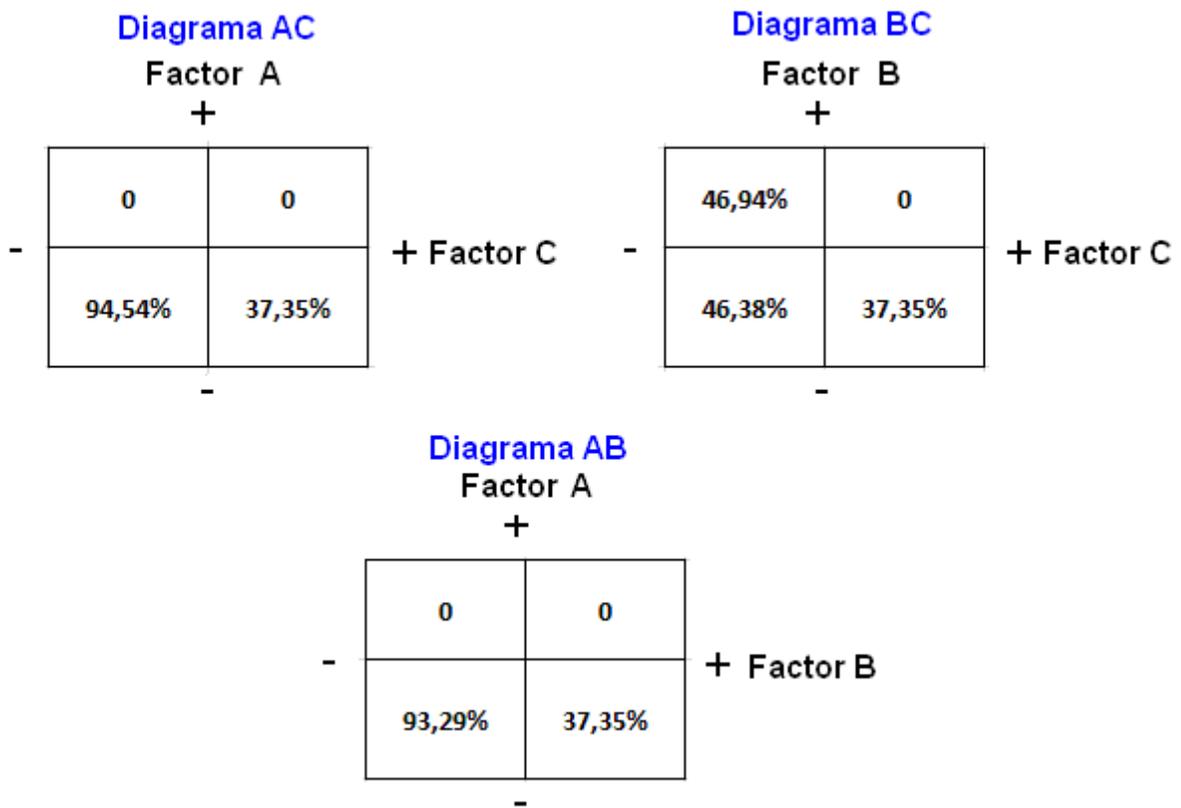


**Figura 13:** Diagrama de Pareto para la recuperación de Metilparatión.

El diagrama de Pareto obtenido señala cuales de las variables estudiadas tienen una incidencia significativa sobre la respuesta. Para la recuperación de Metilparatión este diagrama muestra que todas las variables son significativas y además tienen tendencia negativa, sin embargo el tiempo de extracción es el que exhibe un efecto más marcado sobre la recuperación, el signo negativo indica que la mayor respuesta se tiene a menores tiempos de extracción, es decir, 5 minutos. Se observa en la tabla 24 que para varias condiciones experimentales no se recuperó Metilparatión, se infiere que este al ser un pesticida organofosforado tiene una baja persistencia y se degrada fácilmente cuando es expuesto a altos tiempos de extracción.

Las interacciones entre las variables tiempo, temperatura y concentración también son significativas, es decir que la respuesta del sistema se da en función de la combinación de estos tres factores, para la interacción AB (tiempo-temperatura) y para

la interacción AC (tiempo-concentración) la tendencia es positiva, mientras que para la interacción BC (temperatura-concentración) la tendencia es negativa. Es posible establecer que valores deben tomar las variables que interactúan para que den lugar a una mayor respuesta, para ello se construye un diagrama de interacción [56] como se muestra en la figura 14:



**Figura 14:** diagramas de interacción para el pesticida Metilparatión.

El diagrama muestra los valores promedios de respuesta de acuerdo a las interacciones mostradas. El diagrama AC muestra la interacción de estos dos factores el valor que se muestra en el primer cuadrante (0) corresponde al valor promedio de porcentaje de recuperación para los experimentos cuyos niveles sean A+ y C+ (tiempo de extracción: 10 minutos, concentración de pesticida agregado: 100mg/Kg) la tabla 24



---

---

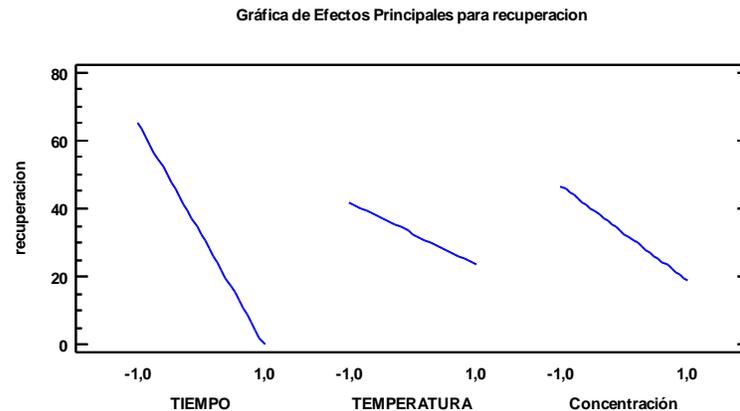
muestra que los experimentos en los que las variables ocupan esos valores son los números: 5 y 7 y sus replicas 13 y 15. Los resultados obtenidos para el resto de los cuadrantes son calculados de la misma manera considerando siempre los niveles involucrados para cada factor. Para el diagrama AC los valores de los factores A y C que dan lugar a mayor recuperación cuando estos interactúan son:  $A(-) = 5$  minutos y  $C(-) = 50\text{mg/Kg}$  y corresponde a los experimentos: 2 y 4 y sus replicas 13 y 15.

En el diagrama BC se obtiene mayor respuesta cuando las variables interactuantes adquieren los valores  $B(+)= 60^{\circ}\text{C}$  y  $C(-)= 50\text{mg/Kg}$ , que corresponde a los experimentos 1 y 2 y sus replicas 9 y 10, lo cual es muy similar en respuesta a la interacción  $B(-)= 40^{\circ}\text{C}$  y  $C(-)= 50\text{mg/Kg}$ , esto acentúa la importancia de que el factor C este en su menor nivel. Finalmente en el diagrama AB se obtiene mayor recuperación cuando las variables adquieren su menor valor, es decir cuando  $A(-)= 5$  minutos y  $B(-) = 40^{\circ}\text{C}$ , que corresponde a los experimentos 4 y 8 y sus replicas 12 y 16.

De los resultados del análisis factorial se visualiza que las condiciones óptimas de extracción son aquella cuyas variables; concentración y tiempo, adquieran el menor valor, es decir que involucre el menor tiempo de extracción y la menor concentración estudiada. De la tabla 24 se observa que las condiciones experimentales que se ajustan a los resultados del análisis factorial corresponde a los experimentos 4 y su replica el experimento 12 y al experimento 2 y su replica el experimento 10 que obtienen altos valores de recuperación, esto se ajusta también a lo arrojado por los diagramas de interacción. Debido a que los valores son muy similares las diferencias pueden atribuirse a errores aleatorios asociados a la experimentación, por tanto a nivel analítico ambas condiciones tienen iguales recuperaciones. Lo que muestra el análisis factorial es consistente con la literatura que indica que el Metilparatión al ser un pesticida organofosforado es poco persistente y se degrada fácilmente, por tanto los menores

tiempos de exposición minimizan la posibilidad de que esto ocurra y la menor concentración expone menos compuesto a la radiación.

La figura 15 muestra el nivel de significancia y la tendencia de las distintas variables sobre la respuesta.

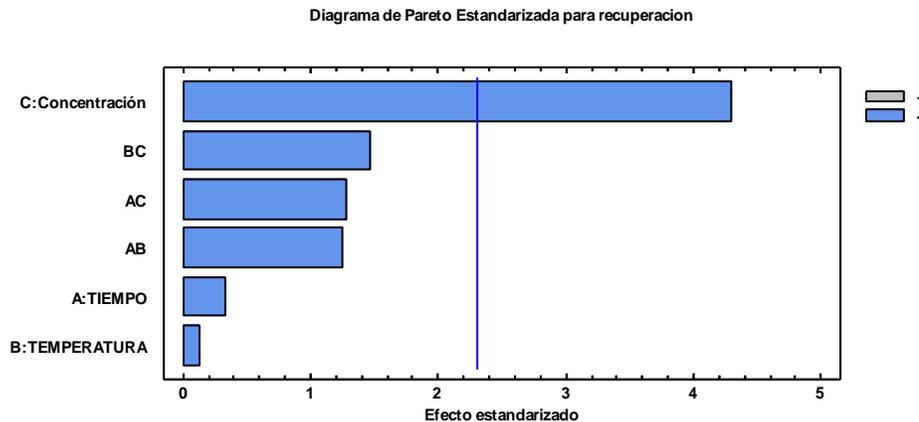


**Figura 15:** Gráfico de efectos principales para la recuperación de Metilparati6n.

Mientras mayor sea la pendiente de una variable en particular mayor es su efecto sobre la recuperaci6n. Se observa el marcado nivel de significancia que exhibe el tiempo de extracci6n, ya que su pendiente es m1s pronunciada, las variables temperatura y concentraci6n son significativas pero con pendientes menos pronunciadas y todas tienen tendencia negativa.

### 7.3.2) Análisis del diseño factorial para la recuperación de Heptacloro.

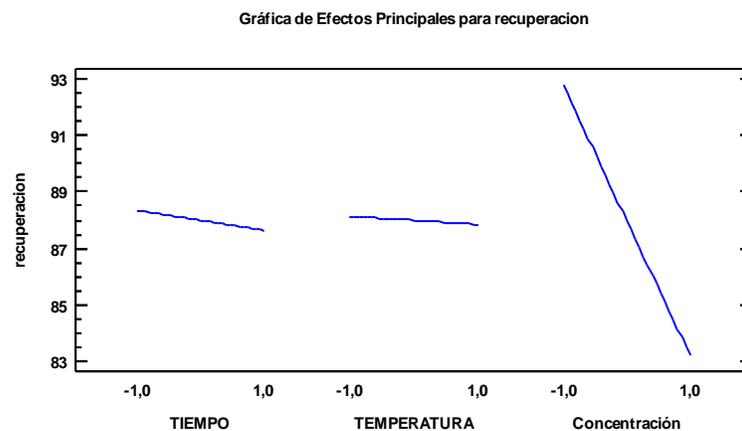
A continuación se presenta el diagrama de Pareto para el análisis del diseño factorial para el Heptacloro.



**Figura 16:** Diagrama de Pareto para la recuperación de Heptacloro.

En el caso del Heptacloro se observa que la única variable significativa es la concentración de pesticida añadido y la misma tiene tendencia negativa por lo que se obtienen mejores recuperaciones cuando esta concentración es menor. Las demás variables experimentales no son significativas, por tanto sus efectos sobre la recuperación carecen de influencia. Se observa en la tabla 24 que a diferencia del Metilparatión se logró recuperación para todos los experimentos llevados a cabo bajo las distintas condiciones experimentales. El Heptacloro al ser un pesticida organoclorado tiene una persistencia mayor que sus pares organofosforados por tanto se puede decir que la radiación microondas que fue aplicada no degradó este pesticida.

Según los resultados del análisis factorial para el Heptacloro la condición de extracción óptima es aquella que involucre la menor concentración para cualquiera de las dos temperaturas y tiempos estudiados. De la tabla 24 vemos que las condiciones óptimas pudiesen ser cualquiera de los experimentos 1 al 4 y sus respectivas replicas experimentos del 9 al 12, sin embargo nótese que se obtuvo mayor recuperación y de manera reproducible para el experimento 2 y su replica el experimento 10. En la figura 17 se observa el grafico de los efectos de cada variable sobre la respuesta.

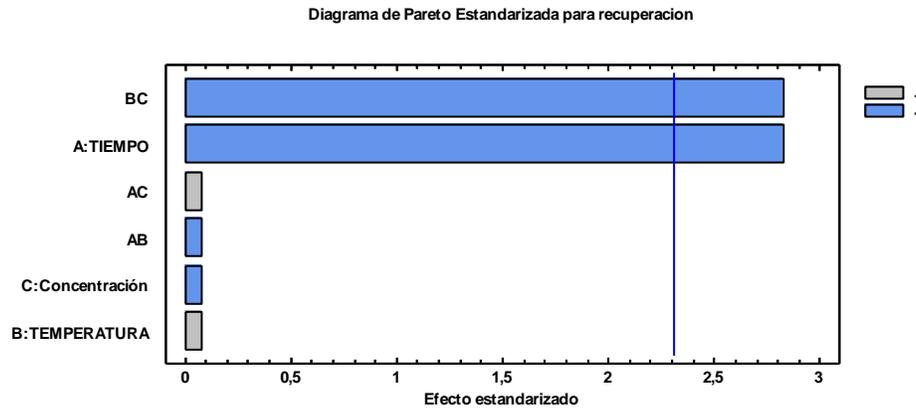


**Figura 17:** Gráfico de efectos principales para la recuperación de Heptacloro.

Podemos observar de acuerdo a las pendientes de las curvas, el marcado efecto negativo de la concentración en comparación con la poca significancia de la temperatura y el tiempo.

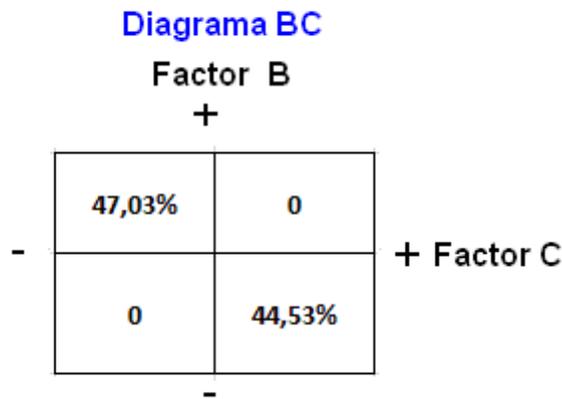
### 7.3.3) Análisis del diseño factorial para la recuperación de Malatión.

A continuación se presenta el diagrama de Pareto obtenido para la recuperación del pesticida Malatión.



**Figura 18:** Diagrama de Pareto para la recuperación de Malatión.

Se observa que las variables significativas para la recuperación de Malatión son el tiempo de extracción y la interacción entre la temperatura y la concentración de pesticida añadido y ambas tienen tendencia negativa. Para el tiempo de extracción se observa que a menores tiempos se obtiene una mayor respuesta del sistema, esto debido a que a mayor tiempo de extracción el pesticida Malatión se encuentra expuesto a una mayor cantidad de radiación microondas, degradándolo y afectando su recuperación tal como se observa en la tabla 24 y en similitud con el pesticida Metilparatión su par organofosforado. Por otro lado aunque las variables concentración y temperatura no son significativas, la interacción de las mismas si lo son, dando lugar a una interacción cuadrática, para precisar que valores deben adquirir estas variables para dar lugar a una mayor respuesta se evalúa el diagrama de interacción en la figura 19.

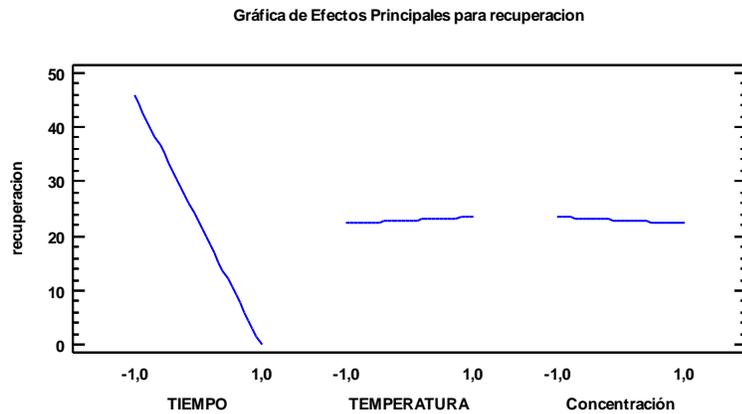


**Figura 19:** diagrama de interacción temperatura- concentración para el pesticida Malatión.

De acuerdo al diagrama de interacción anterior se obtiene mayor recuperación cuando los niveles de los factores son B(+)= 60°C y C(-)= 50mg/Kg, que corresponde a los experimentos 1 y 2 y sus replicas 9 y 10.

De los resultados del análisis factorial para el Malatión observamos que la condición óptima para la extracción por microondas, es la que involucre el menor tiempo de extracción (5 minutos) y de acuerdo con el diagrama de interacción la mayor temperatura (60°C) y la menor concentración de pesticida añadido (50mg/Kg), lo que corresponde exactamente al experimento 2 y sus replica el experimento 10, por tanto se considera esta como la condición experimental óptima para la extracción del pesticida Malatión. Al igual que el Metilparatión, el Malatión da mayor respuesta a menores tiempos de extracción debido a la degradación y poca persistencia por tanto el análisis factorial muestra similar comportamiento para los dos compuestos organofosforados lo cual se ajusta a la similitud en sus propiedades.

A continuación se presenta gráficamente como es la influencia de estos factores sobre la recuperación así como la tendencia de los mismos.

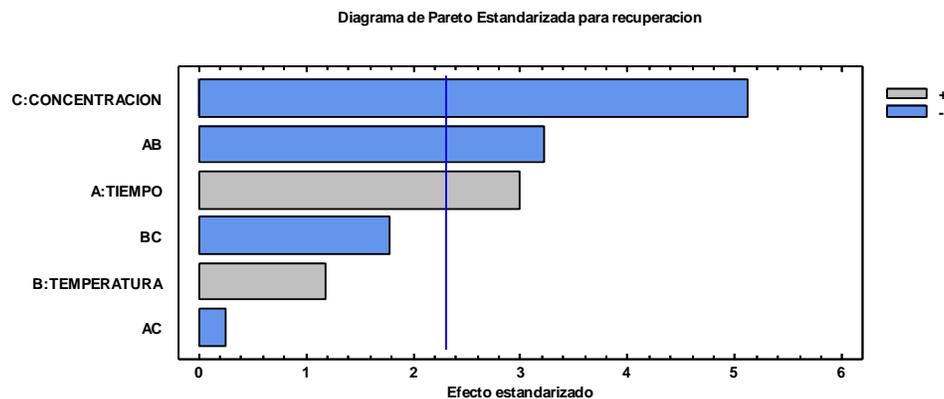


**Figura 20:** Gráfico efectos principales para la recuperación de Malatión.

Se observa que la variable tiempo de extracción tiene una pendiente muy pronunciada es decir su efecto es bastante marcado sobre la recuperación. Las variables temperatura y concentración no son significativas y por tanto sus pendientes son muy bajas.

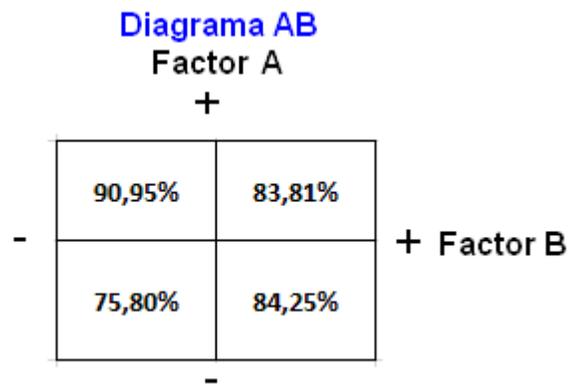
### 7.3.4) Análisis del diseño factorial para la recuperación de Aldrín.

Se presenta en la figura 21 el diagrama de Pareto para el Aldrín.



**Figura 21:** Diagrama de Pareto para la recuperación de Aldrín.

Se puede observar que las variables que tienen un mayor efecto sobre la recuperación del Aldrín son: la concentración de pesticida agregado, el tiempo de extracción y la interacción entre el tiempo y la temperatura de extracción. Nuevamente el signo negativo para la concentración indica que se obtiene mayor respuesta cuando se trabaja en la menor condición es decir 50mg/Kg, en el caso del tiempo cuya tendencia es positiva se obtiene mayores porcentajes de recuperación al mayor tiempo evaluado que es de 10 minutos, así mismo al igual que el Heptacloro, el Aldrín posee una persistencia mayor que sus pares organofosforados, por tanto soporta mayor tiempo de extracción. Por otra parte la temperatura aunque tiene una tendencia positiva no es significativa sin embargo la combinación de los factores A (tiempo) y B (temperatura) si es significativa, la figura 22 muestra el diagrama de interacción entre estas dos variables.

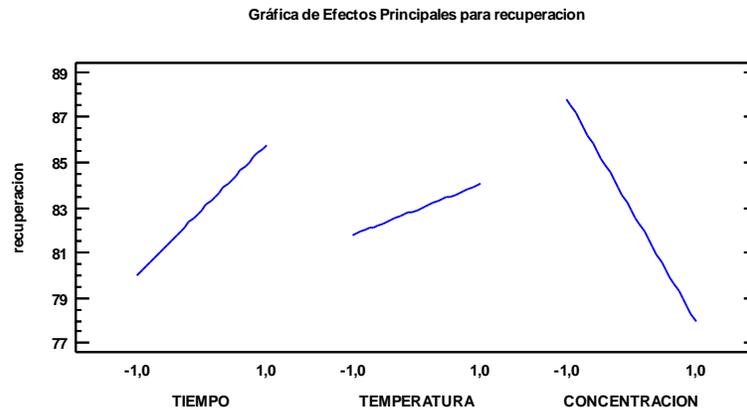


**Figura 22:** Diagrama de interacción tiempo-temperatura para el pesticida Aldrín.

El diagrama indica que para el Aldrín se obtiene mayor recuperación cuando los niveles de los factores son A(+)= 10 minutos y B(-)= 40°C, que corresponde a los experimentos 3 y 7 y sus replicas 11 y 15.

Como síntesis para el Aldrín se obtienen mayores recuperaciones a menor concentración de pesticida añadido (50mg/Kg) y mayor tiempo de extracción (10 minutos), el diagrama de interacción indica además que la temperatura debe estar en su menor nivel (40°C), esto corresponde con el experimento 3 y su réplica y el experimento 11. Aún así se puede observar también para el experimento 2 y su replica el experimento 10 que se obtienen porcentajes de recuperación superior al 90% lo cual es aceptable.

A continuación se muestra gráficamente como son las tendencias y magnitudes de los efectos de estas variables frente a la recuperación del pesticida Aldrín.



**Figura 23:** Grafico de efectos principales para la recuperación de Aldrín.

Se observa en la figura 23 que la concentración tiene una pendiente bastante pronunciada y negativa, lo cual indica una influencia muy grande en el porcentaje de recuperación. En el caso del tiempo la influencia es positiva y de menor proporción aunque sigue siendo significativa según el diagrama de Pareto. Finalmente la temperatura es la que muestra menor pendiente lo que da lugar a menor influencia sobre la respuesta, el diagrama de Pareto (figura 21) muestra que su incidencia no es significativa.

En la tabla 25 se resume las condiciones óptimas de extracción para cada pesticida en base a la evaluación de los resultados del análisis factorial para el diseño de experimento propuesto, así como el valor promedio de porcentaje de recuperación para cada condición y su réplica.

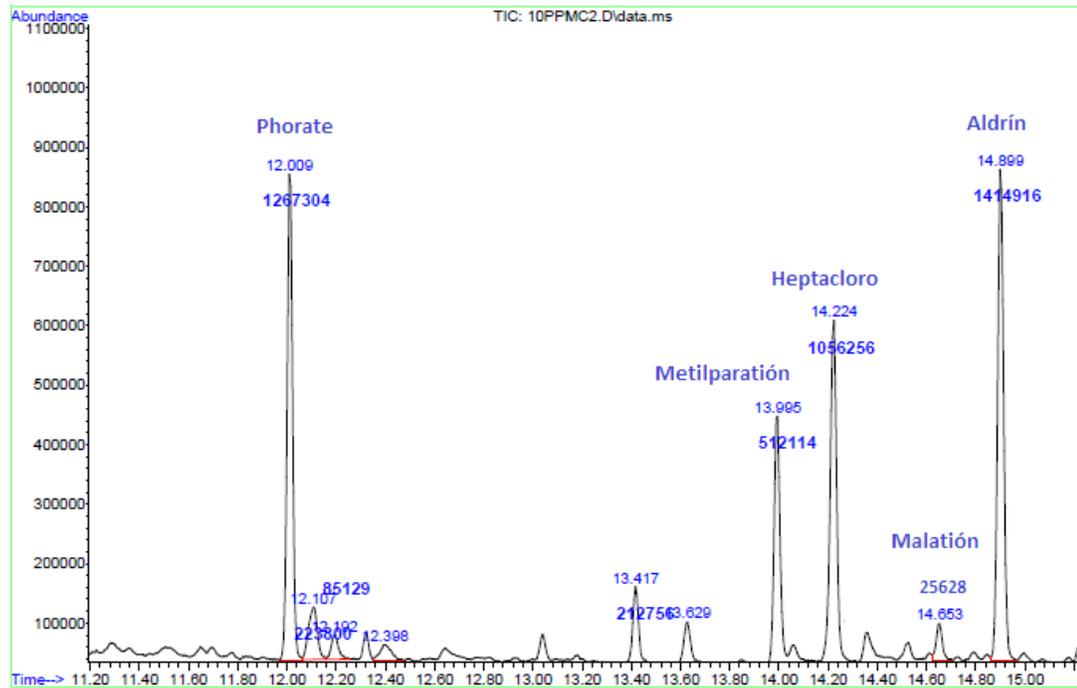


**Tabla 25:** Condiciones experimentales óptimas para cada pesticida en la extracción asistida por microondas.

<b>Pesticida</b>	<b>Factor A Tiempo (min)</b>	<b>Factor B Temperatura °C</b>	<b>Factor C Concentración (mg/Kg)</b>	<b>% Recuperación promedio</b>
<b>Metilparatión</b>	5	60	50	93,82
<b>Heptacloro</b>	5	60	50	90,96
<b>Malatión</b>	5	60	50	94,07
<b>Aldrín</b>	10	40	50	91,52

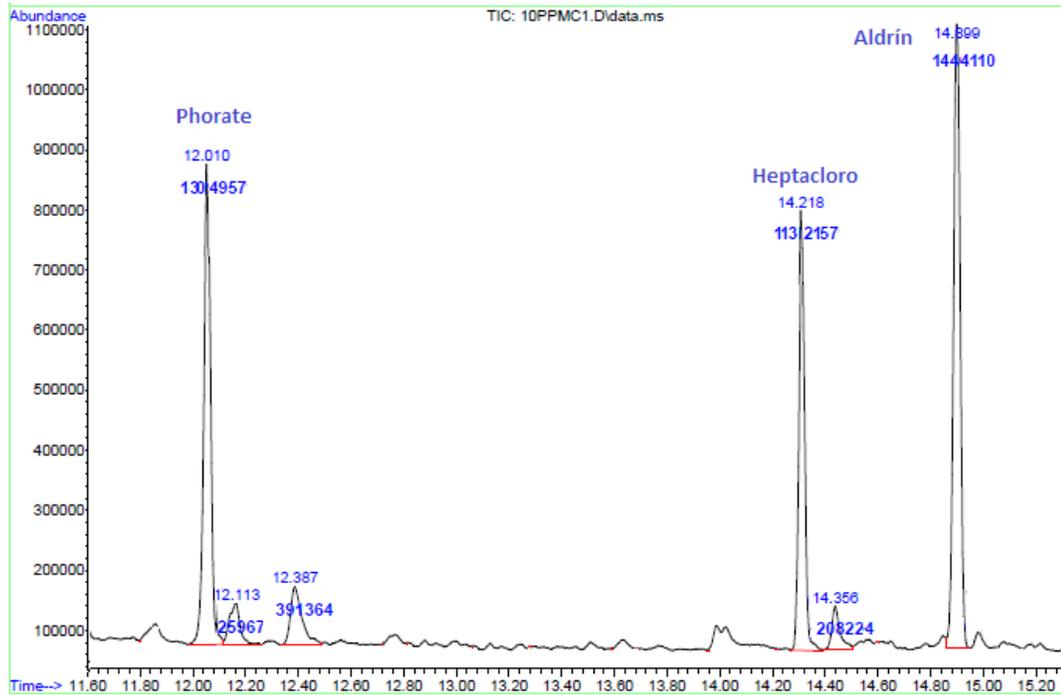
Bajo estas condiciones todos los pesticidas tienen porcentajes de recuperación superior al 90%, debido a que el Aldrín bajo la condición experimental de 5 minutos y 60°C también recupera más del 90% del pesticida agregado, se considerará este tiempo como el óptimo para todos los pesticidas evaluados. Los resultados coinciden con lo que ha sido obtenido por diversos autores entre ellos Pilypiw [48] donde se deben optimizar los parámetros de extracción por microondas individualmente en función del pesticida a estudiar y de la matriz utilizada.

La figura 24 muestra el cromatograma obtenido bajo las condiciones consideradas como óptimas para todos los pesticidas evaluados que corresponde al experimento número 2: Tiempo de extracción 5 minutos, temperatura: 60°C, concentración añadida de pesticida de 50mg/Kg.



**Figura 24:** Cromatograma de la condición óptima para la extracción asistida por microondas.

El cromatograma anterior muestra como se logra recuperar la totalidad de los pesticidas evaluados, cosa que no se cumple en todas las condiciones experimentales evaluadas. La figura 25 muestra el cromatograma obtenido para una condición experimental no óptima en la extracción asistida por microondas.



**Figura 25:** Cromatograma de una condición menos favorable para la extracción asistida por microondas.

Bajo estas condiciones se obtuvo la menor recuperación para los pesticidas Aldrin y Heptaclo, se observa también que no se recuperó los pesticidas organofosforados Malatión y Metilparatión, la extracción asistida por microondas en sus condiciones más fuertes similares a una digestión, logra descomponer los pesticidas organofosforados lo cual concuerda con la poca persistencia de los mismos.



### 7.3.5) Parámetros analíticos de calidad para la extracción asistida por microondas.

Se analiza a continuación los parámetros de calidad analítica para la condición óptima de la extracción asistida por microondas. En primer lugar se evalúa la precisión del método de extracción, donde se estudia el grado de concordancia de los datos obtenidos de forma independiente y bajo una misma condición experimental, entre ellos tenemos la desviación estándar (S), desviación estándar relativa (RSD), el coeficiente de variación (CV), la varianza ( $S^2$ ) y la dispersión. La tabla 26 muestra los valores obtenidos para estos parámetros.

**Tabla 26:** Parámetros de precisión para la condición óptima del método extracción asistida por microondas.

Pesticida	Concentración determinada	S	RSD	CV(%)	S <sup>2</sup>	dispersión
Metilparatión	44±1	1	0,02	2	1	2
Heptacloro	43±2	2	0,05	5	4	2
Malatión	40±1	1	0,03	3	1	2
Aldrín	41±1	1	0,02	2	1	2

Los resultados obtenidos muestran que para la condición óptima del método de extracción asistida por microondas, la precisión es similar para los diferentes pesticidas evaluados esto se puede corroborar con los valores de desviación estándar y los valores de coeficiente de variación que son menores al 4%, lo cual es bueno ya que para los métodos cromatográficos se aceptan valores de coeficiente de variación menores al 10%.



Para los parámetros de exactitud del método hay tres términos principales a discutir: el porcentaje de recuperación, el error absoluto y el error relativo. Todos estos parámetros comparan la cantidad obtenida de analito con la cantidad que había inicialmente en la matriz, la cual debe ser conocida. La tabla 27 muestra los resultados obtenidos para estos parámetros.

**Tabla 27:** Parámetros de exactitud para la condición óptima del método extracción asistida por microondas.

<b>Pesticida</b>	<b>Porcentaje de recuperación</b>	<b>Error absoluto</b>	<b>Error relativo</b>
<b>Metilparatión</b>	93,82	5,99	0,12
<b>Heptacloro</b>	94,96	7,33	0,15
<b>Malatión</b>	94,07	9,82	0,20
<b>Aldrín</b>	90,97	8,76	0,18

El porcentaje de recuperación es el parámetro más útil para determinar la exactitud de los métodos de extracción estudiados, puesto que la evaluación de ellos se basa precisamente en la obtención de los pesticidas después de la extracción, cuando ha sido agregada una cantidad conocida del compuesto en un proceso definido en inglés como spike. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC por sus siglas en inglés) ha establecido que para que un método de análisis sea exacto y fiable debe dar lugar a valores de porcentaje de recuperación entre 80 y 115%, en base al grado de asociación entre el analito y la matriz [57] en base a esto se puede afirmar que el método de extracción asistida por microondas es exacto bajo las condiciones experimentales optimizadas. Los valores de error absoluto y error relativo por su parte muestran la diferencia absoluta y relativa entre la cantidad recuperada y la cantidad añadida, esto va a depender mucho de las interacciones entre los pesticidas y la matriz de muestra y de la cantidad de muestra empleada.



#### 7.4) Evaluación del Método de extracción QuEChERS.

En la tabla 28 se muestra los valores de recuperación obtenidos para la extracción QuEChERS.

**Tabla 28:** Valores de recuperación del método de extracción QuEChERS para cada concentración de pesticida añadido.

<b>Pesticida</b>	<b>Concentración determinada para una adición de 10mg/Kg</b>	<b>Concentración determinada para una adición de 20mg/Kg</b>
<b>Metilparatión</b>	8,1±0,5	16,6±0,5
<b>Heptacloro</b>	7,5±0,3	17,5±0,5
<b>Malatión</b>	8,2±0,4	14,7±0,5
<b>Aldrín</b>	8,5±0,1	17,6±0,7

Debido a que el método de extracción QuEChERS es un protocolo cuyas etapas y variables ya están definidas, no se requiere hacer un proceso de optimización, por tanto para evaluar cual de las extracciones a diferentes concentraciones añadidas de pesticidas es más efectiva debe evaluarse los parámetros de precisión y exactitud para cada concentración de pesticida agregado.

##### 7.4.1) Parámetros analíticos de calidad para la extracción QuEChERS.

En la tabla 29 se presenta los parámetros de precisión de los diferentes pesticidas evaluados para el método de extracción QuEChERS a una concentración añadida de pesticida de 10mg/Kg.



**Tabla 29:** Parámetros de precisión para el método de extracción QuEChERS a una concentración añadida de pesticida de 10mg/Kg.

Pesticida	Concentración determinada	S	RSD	CV(%)	S <sup>2</sup>	dispersión
Metilparatión	8,1±0,5	0,5	0,06	6	0,25	1,3
Heptacloro	7,5±0,3	0,3	0,04	4	0,09	0,6
Malatión	8,2±0,4	0,4	0,05	5	0,12	0,7
Aldrín	8,5±0,1	0,1	0,01	1	0,01	0,3

Como puede observarse los valores de precisión son pequeños, lo que significa una precisión aceptable para todos los compuestos evaluados, el valor de la desviación estándar es menor a la unidad y los valores de coeficiente de variación son menores al 10%. En la tabla 30 se presentan los parámetros de exactitud.

**Tabla 30:** Parámetros de exactitud para el método de extracción QuEChERS a una concentración añadida de pesticida de 10mg/Kg.

Pesticida	Porcentaje de recuperación	Error absoluto	Error relativo
Metilparatión	86,87	1,94	0,19
Heptacloro	84,42	2,51	0,25
Malatión	92,86	3,85	0,39
Aldrín	94,72	1,51	0,15

Como se observa los valores de porcentaje de recuperación son superiores a 80%, por lo que se puede afirmar según lo discutido anteriormente, que la exactitud del método es aceptable; los valores de errores absolutos y relativos dependen en gran medida de la interacción de cada pesticida con la muestra.

Se presenta a continuación los parámetros de precisión y exactitud, para el método de extracción QuEChERS a una concentración añadida de pesticida de 20mg/Kg. La tabla 31 muestra los resultados obtenidos para el parámetro de precisión.

**Tabla 31:** Parámetros de precisión para el método de extracción QuEChERS a una concentración añadida de pesticida de 20mg/Kg.

Pesticida	Recuperación	S	RSD	CV (%)	S <sup>2</sup>	Dispersión
<b>Metilparatión</b>	16,6±0,5	0,5	0,03	3	0,25	0,9
<b>Heptacloro</b>	17,5±0,5	0,5	0,03	3	0,25	0,9
<b>Malatión</b>	14,7±0,5	0,5	0,03	3	0,25	1,0
<b>Aldrín</b>	17,6±0,7	0,7	0,04	4	0,49	1,3

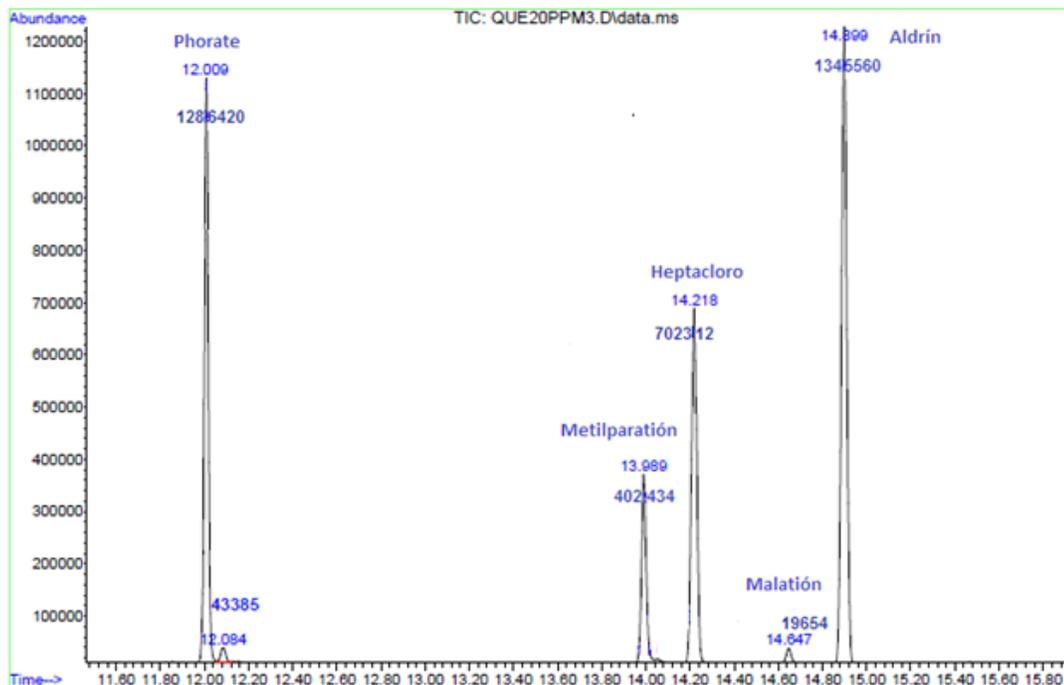
Los valores de precisión muestran que el método tiene una precisión adecuada para la determinación de todos los pesticidas con valores de desviación estándar menores a la unidad y valores de coeficiente de variación que no superan el 4%. La tabla 32 muestra los valores obtenidos para los parámetros de exactitud.

**Tabla 32:** Parámetros de exactitud para el método de extracción QuEChERS a una concentración añadida de pesticida de 20mg/Kg.

Pesticida	Porcentaje de recuperación	Error absoluto	Error relativo
<b>Metilparatión</b>	86,04	2,44	0,12
<b>Heptacloro</b>	94,48	2,52	0,13
<b>Malatión</b>	83,44	5,32	0,27
<b>Aldrín</b>	94,07	3,38	0,17

Como se observa los porcentajes de recuperación obtenidos dan lugar a un método exacto pues superan el valor de 80%.

La figura 26 muestra un cromatograma del proceso de extracción QuEChERS a una concentración añadida de pesticida de 20ppm, se observa la obtención de todos los compuestos estudiados en el orden de elución esperado.



**Figura 26:** Cromatograma del método de extracción QuEChERS a una concentración añadida de pesticida de 20mg/Kg.

### 7.5) Comparación entre el método de extracción asistida por microondas y el método de extracción QuEChERS.

En el apartado anterior quedó demostrado que tanto la extracción asistida por microondas como el método de extracción QuEChERS tienen parámetros estadísticos de precisión y exactitud aceptables para la determinación de los pesticidas estudiados.



---

---

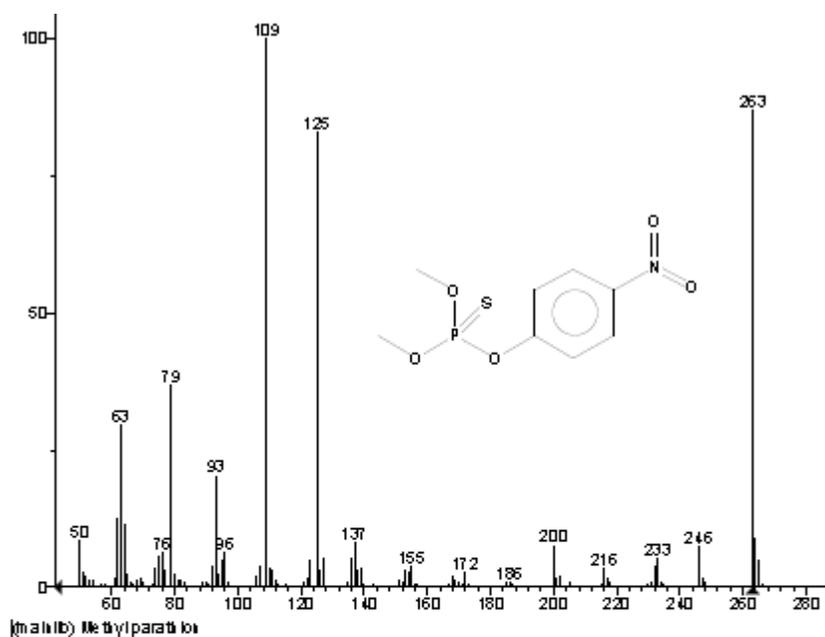
en muestras de fresas, por tanto se puede emplear cualquiera de los dos métodos para el análisis, por lo que surge la discusión de cual método es más conveniente al momento de ser aplicado. Esta elección debe hacerse en base al interés que se tiene como analista y a los recursos disponibles al momento de trabajar con los métodos de extracción.

Los equipos de radiación microondas son costosos, por tanto algunos laboratorios pueden no contar con este tipo de tecnología, el proceso de tratamiento de muestra es laborioso, debido a los diversos pasos a ser aplicados, adicionalmente debe optimizarse las variables experimentales de extracción en función de los pesticidas a determinar y la matriz donde se encuentran. No obstante este método tiene una gran ventaja y es que se puede hacer la extracción de forma simultánea a varias muestras dependiendo de la capacidad del equipo, lo cual es muy útil cuando se trabaja con numerosas muestras.

El método QuEChERS por su parte tiene la ventaja de ser más sencillo de aplicar, los extractos obtenidos son más limpios, ya que se evita la descomposición de azúcares y otros compuestos presentes en los alimentos por acción del calor, no obstante este método debe ser aplicado en secuencia una muestra a la vez.

#### **7.6) Análisis de las muestras obtenidas según la normativa codex alimentarius.**

Para el análisis se aplicó los protocolos de extracción asistida por microondas y QuEChERS para la muestra representativa obtenida a través del muestreo codex alimentarius, con la intención de determinar la presencia o ausencia de los pesticidas estudiados. Para llevar a cabo esta determinación se comparó tanto los tiempos de retención expresados en la tabla 15 como los espectros de masas de cada pesticida, estos últimos se ilustran en la figura 27 y 28



Name: Methylparathion

Formula: C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub>PS

MW: 263 CAS#: 298-00-0 NIST#: 118979 ID#: 73516 DB: mainlib

Other DBs: RTECS, EPA, EINECS, IRDB

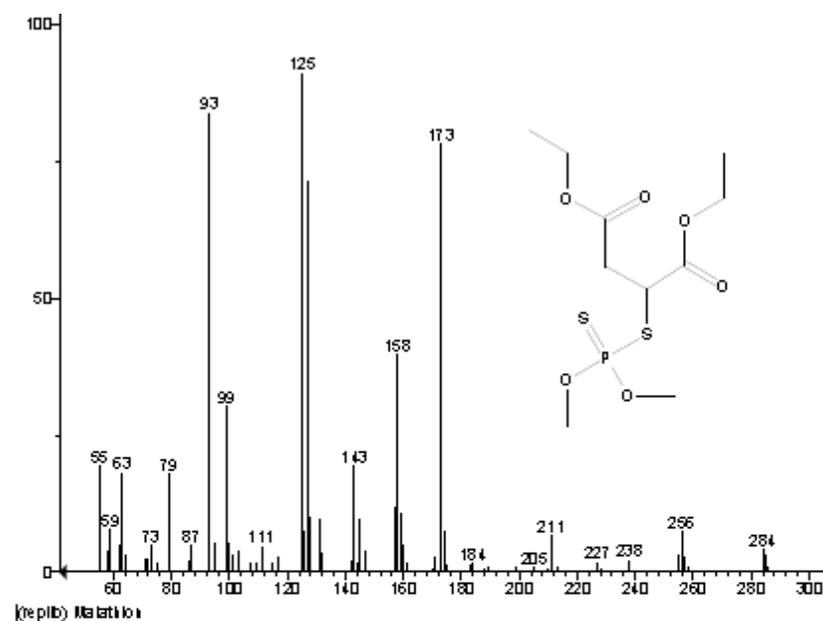
Contributor: NIST Mass Spectrometry Data Center, 1990.

10 largest peaks:

109 999 | 263 868 | 125 827 | 79 366 | 63 293 |  
47 245 | 93 202 | 62 124 | 30 122 | 64 114 |

Synonyms:

1. Phosphorothioic acid, O,O-dimethyl O-(4-nitrophenyl) ester
2. Phosphorothioic acid, O,O-dimethyl O-(p-nitrophenyl) ester
3. Azofos
4. Azophos
5. BAY 11405



Name: Malathion

Formula: C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O<sub>6</sub>PS<sub>2</sub>

MW: 330 CAS#: 121-75-5 NIST#: 289459 ID#: 277 DB: replib

Other DBs: RTECS, EPA, USP, HODOC, NIH, EINECS, IRDB

Contributor: VERIFINN

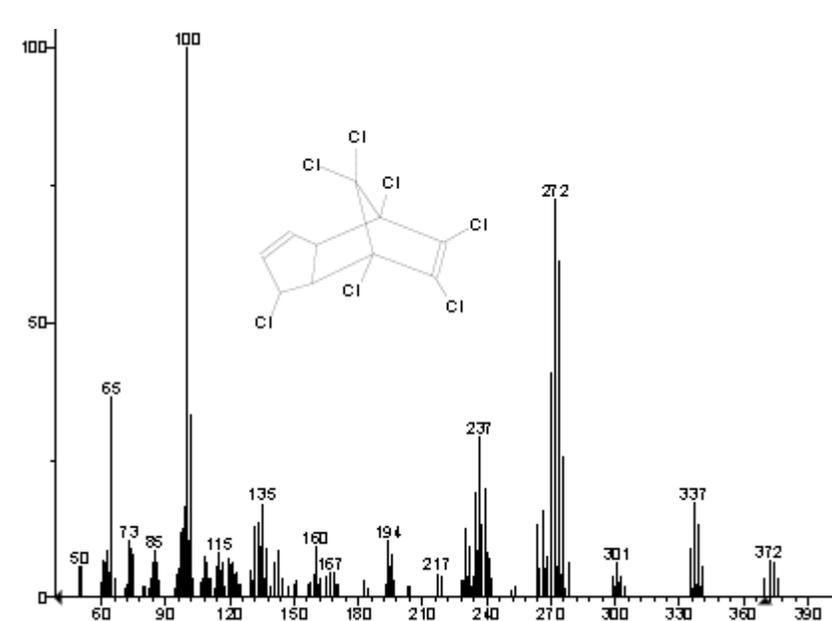
10 largest peaks:

29 999 | 125 909 | 93 837 | 173 779 | 127 712 |  
27 409 | 158 395 | 99 301 | 47 200 | 55 193 |

Synonyms:

1. Butanedioic acid, [(dimethoxyphosphinothioyl)thio]-, diethyl ester
2. Succinic acid, mercapto-, diethyl ester, S-ester with O,O-dimethyl phosphorodithioate
3. [(Dimethoxyphosphinothioyl)thio]butanedioic acid, diethyl ester
4. American Cyanamid 4,049
5. Carbetox

Figura27: Espectros de masa de los pesticidas Metilparatión y Malatión.



(mainlib) Heptachlor

Name: Heptachlor

Formula:  $C_{10}H_5Cl_7$

MW: 370 CAS#: 76-44-8 NIST#: 114991 ID#: 63017 DB: mainlib

Other DBs: RTECS, EPA, HODOC, NIH, EINECS, IRDB

Contributor: NIST Mass Spectrometry Data Center, 1990.

10 largest peaks:

100 999 | 272 722 | 274 610 | 270 408 | 65 364 |

102 330 | 237 290 | 276 256 | 39 223 | 239 198 |

Synonyms:

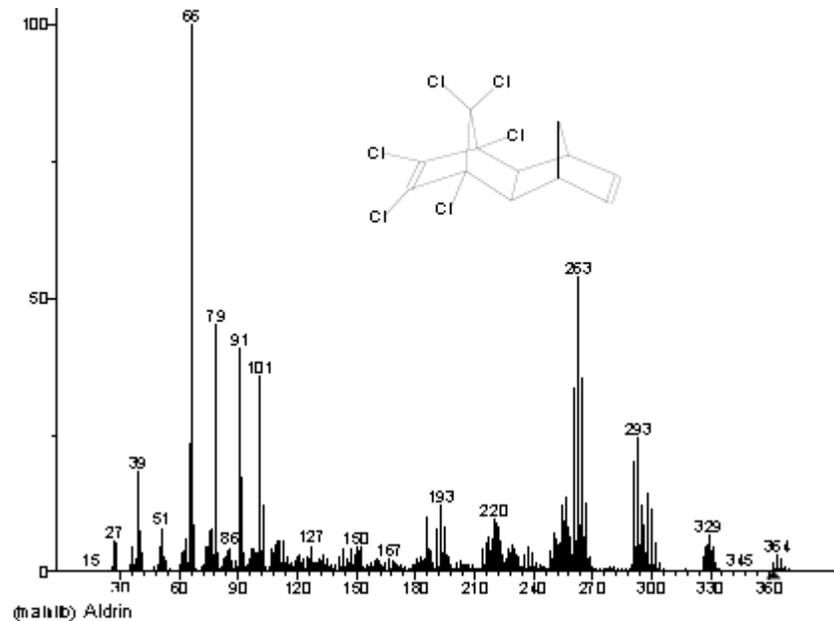
1. 4,7-Methano-1H-indene, 1,4,5,6,7,8,8-heptachloro-3a,4,7,7a-tetrahydro-

2. 4,7-Methanoindene, 1,4,5,6,7,8,8-heptachloro-3a,4,7,7a-tetrahydro-

3. Aahepta

4. Agroceres

5. E 3314



(mainlib) Aldrin

Name: Aldrin

Formula:  $C_{12}H_6Cl_6$

MW: 362 CAS#: 309-00-2 NIST#: 232555 ID#: 28343 DB: mainlib

Other DBs: Fine, RTECS, EPA, HODOC, NIH, EINECS, IRDB

Contributor: Japan AIST/NIMC Database- Spectrum MS-NW-4101

10 largest peaks:

66 999 | 263 537 | 79 451 | 91 408 | 101 356 |

265 354 | 261 335 | 293 244 | 65 234 | 291 201 |

Synonyms:

1. 1,2,3,4,10,10-Hexachloro-1,4,4a,5,8,8a-Hexahydro-1,4-endo-5,8-dimethanonaphthalene

2. Kortofin

3. Compound 118

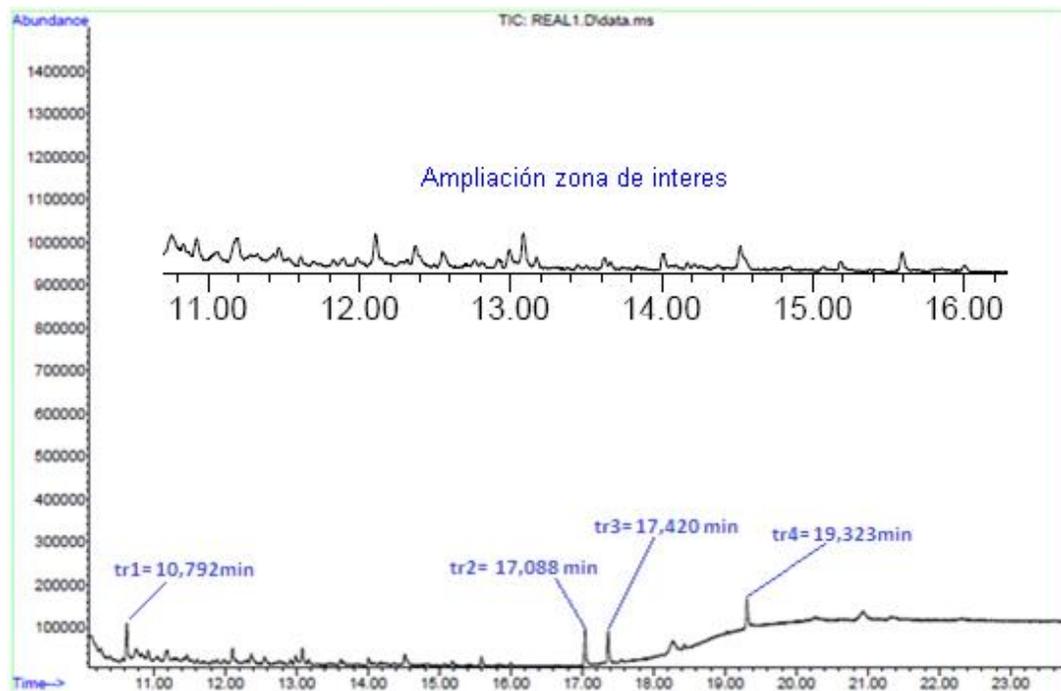
4. 1,4,5,8-Dimethanonaphthalene, 1,2,3,4,10,10-hexachloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahydro-, endo,exo-

5. Aldocit

Figura 28: Espectros de masa de los pesticidas Heptachloro y Aldrín.

Los espectros de masa mostrados para cada compuesto es la herramienta más útil para la identificación, pues estos son inherentes a cada compuesto particular lo que conlleva a una identificación inequívoca.

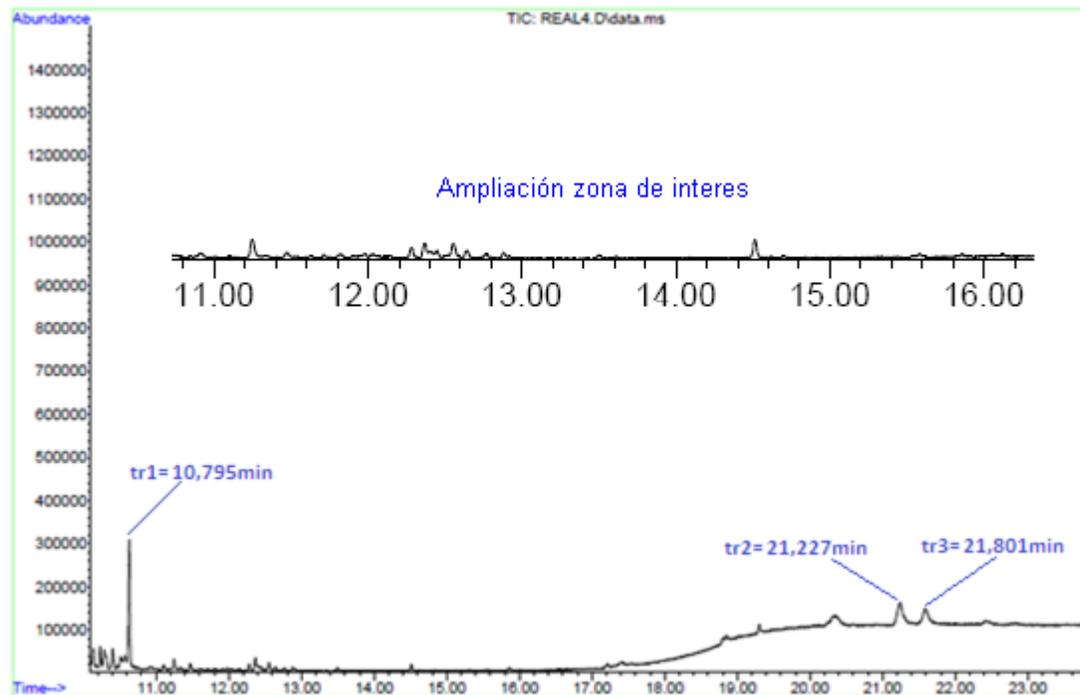
. En la figura 29 muestra el cromatograma obtenido para la muestra representativa por el método de extracción asistida por microondas.



**Figura 29:** Extracción asistida por microondas para la muestra representativa obtenida a través de la normativa codex alimentarius.

En el cromatograma de la figura anterior se observa ningún pico correspondiente a los compuestos estudiados a los tiempos de retención que eluyen: Metilparatión  $tr=13,989\text{min}$ ; Heptacloro  $tr=14,218\text{min}$ ; Malatión  $tr=14,647\text{min}$  y Aldrín  $14,899\text{min}$ . Igualmente esto fue corroborado por la búsqueda de los iones correspondiente a cada espectro de masas de cada compuesto (figuras 27 y 28), la ausencia tanto de los picos cromatográficos como de los espectros de masa indica que no hay residuos de los pesticidas evaluados en la muestra recolectada.

La figura 30 muestra el cromatograma obtenido para la muestra representativa por el método de extracción QuEChERS.



**Figura 30:** Extracción QuEChERS para la muestra obtenida a través del codex alimentarius.

Para la extracción QuEChERS se observa igualmente la ausencia de los compuestos organoclorados y organofosforados estudiados a los tiempos de retención ya mencionados, esto se confirma a través de los iones de los espectros de masas de los picos evaluados.

Ambos métodos de extracción no presentaron residuos de pesticidas para la muestra recolectada. Aunque compuestos de la familia de los organofosforados fueron empleados por los productores de los frutos, la poca persistencia de los mismos pudo

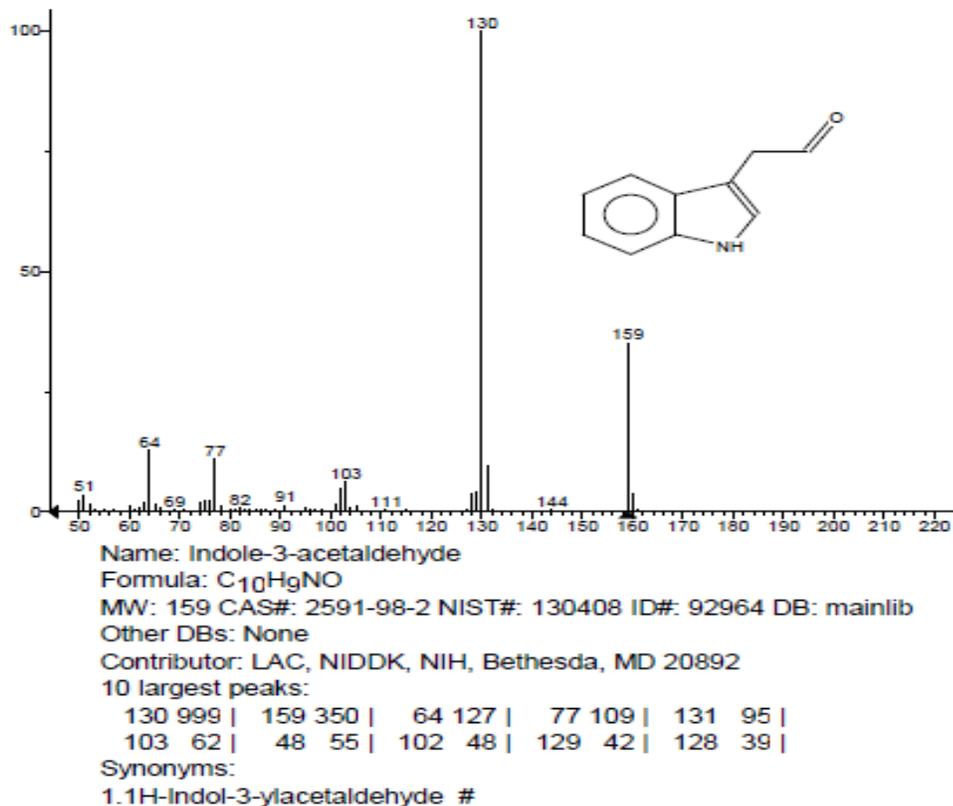


---

---

causar su ausencia en el análisis de las muestras, mientras que los pesticidas organoclorados son empleados cada vez menos por los agricultores. Destaca la presencia de un mayor número de picos cromatográficos en el caso de la extracción asistida por microondas con respecto al método QueChERS, por lo que el paso de limpieza empleando la amina primaria secundaria en este último método, pudiese ser el causante de la atenuación o eliminación de estos picos, ya que como se explicó anteriormente, la misma suprime algunos ácidos orgánicos, sustancias polares y otros compuestos que pudiesen interferir en el análisis.

Para ambos métodos de extracción la identidad de los compuestos que corresponden a los pequeños picos observados pueden ser identificados a través de sus respectivos espectros de masas. En ambos cromatogramas hay un pico que resalta a un tiempo de retención cercano a 11 minutos, la comparación del espectro de masa generado por este pico con la biblioteca de espectros de masas Nist MS 2.0 indicó que corresponde al indol-3-acetaldehído que es conocido también como ionol el cual posee propiedades antioxidantes. Se muestra en la figura 31 el espectro de masa correspondiente a este compuesto.

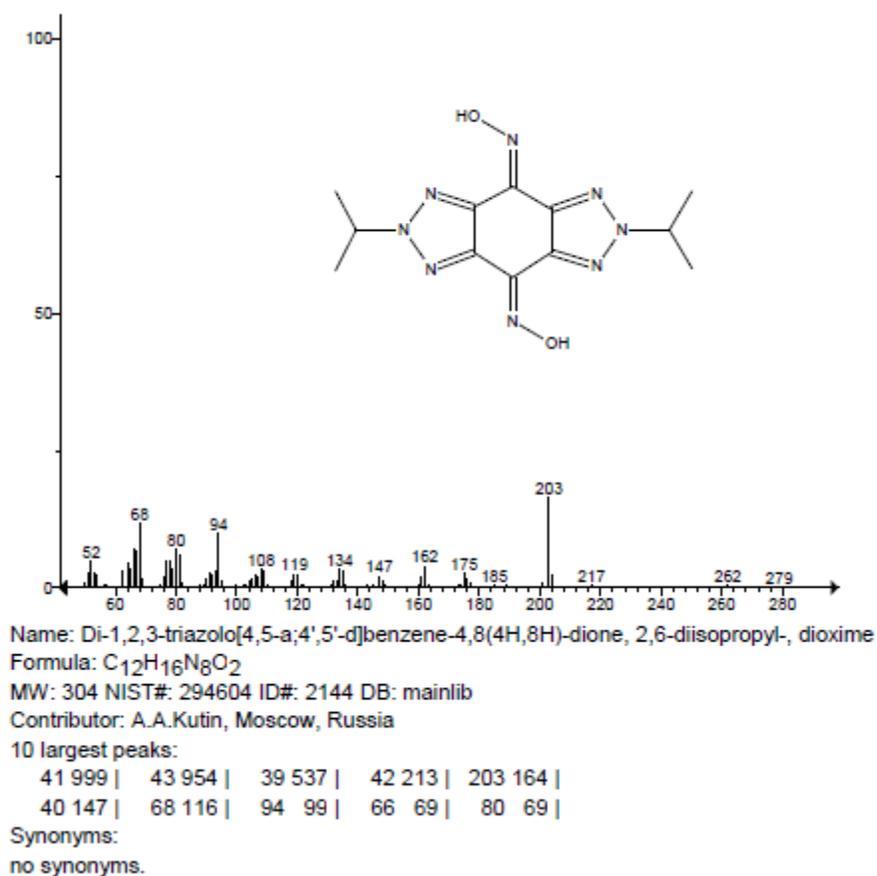


**Figura 31:** Espectro de masas y datos del indol-3-acetaldehido.

Con respecto a los otros picos presentes en el cromatograma de la extracción asistida por microondas, la identificación de los espectros de masa dio lugar a los siguientes compuestos: ácido oleico (tr<sub>2</sub>= 17,088min), ácido octadecatreinoico (tr<sub>3</sub>= 17,420min) y ácido heptadecenoico (tr<sub>4</sub>= 19,323min), Todos estos son ácidos grasos de cadena larga presentes en diversos frutos. Los otros picos resaltantes de la extracción QuEChERS corresponden al 1-heptatriacotanol (tr<sub>2</sub>= 21,227min) y a un fenol conocido como ionol 2 (tr<sub>3</sub>= 21,801min)

Las fresas son una matriz con una gran cantidad de compuestos orgánicos propios del fruto. Los compuestos anteriormente nombrados se encuentran de forma natural en las fresas [58] y varios de estos compuestos están asociados a beneficios a la salud, como los ácidos de cadena larga conocidos como ácidos grasos y los

antioxidantes. Se observó la presencia de iones relacionados a un compuesto de la familia de los triazoles que se emplean como fungicidas en la agricultura y también en el área de la medicina, este tipo de compuesto pudo haber sido transferido bien sea en fumigaciones pasadas o por transferencia, los residuos que se encontraron están a niveles tan bajos que su pico cromatográfico no es perceptible. La figura 32 muestra el espectro de masa, la estructura química y otros datos de este compuesto.



**Figura 32:** Espectro de masas del fungicida tipo triazol encontrado en la muestras.



---

---

## 8) CONCLUSIONES

- ✓ La extracción asistida por microondas permitió la recuperación de los pesticidas organoclorados para todas las condiciones estudiadas y de los pesticidas organofosforados sólo para dos de estas condiciones.
- ✓ El diseño de experimento por análisis factorial determinó que la condición experimental óptima en la extracción asistida por microondas corresponde a una temperatura de 60°C, una concentración añadida de pesticida de 50mg/Kg y para un tiempo de extracción de 5 minutos; para los pesticidas Metilparatión, Heptacloro y Malatión mientras que para el pesticida Aldrín la condición óptima resultó ser a una temperatura de 60°C a una concentración añadida de pesticida de 50mg/Kg y a un tiempo de extracción de 10 minutos. Sin embargo para el tiempo de extracción de 5 minutos se obtienen valores de recuperación superiores a 90% lo cual es aceptable.
- ✓ Los parámetros analíticos de calidad para el método de extracción asistida por microondas indica que el método tiene una precisión y exactitud aceptables para los pesticidas estudiados, con Coeficientes de variación menores a 5% y recuperaciones mayores a 90%
- ✓ EL método QuEChERS resultó ser preciso y exacto para los pesticidas estudiados a las dos concentraciones de pesticida añadidas con coeficientes de variación menores a 6% y recuperaciones mayores a 86%.
- ✓ No se detectaron los compuestos organoclorados ni organofosforados estudiados en la muestra representativa expuesta a pesticidas, esta verificación se hizo en base a los tiempos de retención de los compuestos como a los espectros de masa de cada pesticida.



---

---

## 9) RECOMENDACIONES

- ✓ Evaluar otros pesticidas de la misma familia: organoclorados y organofosforados, o diferente familia como: carbamatos piretroides entre otros en matrices de fresas, con el fin de determinar si los métodos de extracción aquí estudiados son aceptables para los mismos.
  
- ✓ Evaluar los métodos de extracción estudiados para la determinación de pesticidas de diferentes familias empleando otras matrices de frutos y alimentos.
  
- ✓ Establecer parámetros de calidad analítica de cada método bajando los niveles de concentración de pesticida evaluados, con el fin de determinar el límite en el cual esta variable, no es significativa para los métodos de extracción estudiados.



---

---

## 10) REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] International program on chemical safety & environmental health Criteria: **Principles for the toxicological assessment of pesticide residues in food**, [Bibliografía] World Health Organization WHO (Nueva York, Estados Unidos de America) Referencia: 2006, 152p. disponible desde: WHO, United Nations Organization.
- [2] Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierra: **Publicaciones del Banco Agrícola de Venezuela Séptimo Censo Agrícola Nacional**, [pagina Web] (Caracas, Venezuela) consultado abril 2012, disponible en [http://www.bav.com.ve/noticias/ver/id\\_noticia/241](http://www.bav.com.ve/noticias/ver/id_noticia/241), compatible con navegador Google Chrome ® o superior.
- [3] Gil, María. **Informe ciudadano de la situación de los contaminantes orgánicos persistentes en Venezuela. Proyecto Internacional de Eliminación de los COP**, [Bibliografía]: Fundación Agua Clara (Caracas, Venezuela) Referencia: 2006. 31p. Disponible desde: Fundación Agua Clara, Caracas Venezuela.
- [4] Rojas M, Agreda O, Infante S. **A preliminary statistical of wether pesticide use could be related to birth defects in rural area of Venezuela**, Agosto 2008 Revista de salud pública 10(1): págs 85-93.
- [5] Plaza María, Galban Javier, Sanz Jesús **Estudio de degradación de los pesticidas etiofencarb y malatión en muestras de manzanas por cromatografía gaseosa**, Febrero 1994 Departamento de Química, Universidad de la Rioja, Argentina ISSN 0213-4306, págs. 243-246.
- [6] **L Yinghan, C. Zhengmei, N Xinhua** Extraction of organochlorine pesticides in sediments using soxhlet, ultrasonic and accelerated solvent extraction techniques, **Abril 2005, Journal of Ocean University of China ISSN: 1672-5182 4(2) págs 173-176.**



- 
- [7] **J. You, D. Weston y M. Lydy A Sonication Extraction Method for the Analysis of Pyrethroid, Organophosphate, and Organochlorine Pesticides by Gas Chromatography with Electron-Capture Detection**, Junio 2004, archives of environmental contamination and toxicology 47( 2) , págs 141-147.
- [8] Sanchez-Brunette, Rodriguez A y Tadeo J. **Multiresidue analysis of carbamate pesticides in soil by sonication-assisted extraction in small columns and liquid chromatography**. Julio 2003, Journal of Chromatography Acta1007(1-2), págs 85-91.
- [9] S. Lehotay, K. Eller, **Development of a method of analysis for 46 pesticides in fruits and vegetables by supercritical fluid extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry**, Junio 1995 Journal of AOAC International v. 78, págs 120-126.
- [10] W. Fiddler, J. Pensabene, R. Gates, y D. Donoghue **Supercritical fluid extraction of organochlorine pesticides in eggs**. Enero 1999 Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(1), págs 206-211.
- [11] A. Bouaid, A.Martin, L. Esteban, **P. Fernández y C. Cámara, Microwave-assisted extraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in oranges by gas chromatography (GC)**, Mayo 2000, Fresenius Journal of Analytical Chemistry **367( 3)**, págs 291-294.
- [12] M. Andrea y G. Jairo **Extracción de residuos de plaguicidas en suelos asistida por ultrasonido** Diciembre 2010, Revista Colombiana de Química, 39(3) págs. 371-387.
- [13] Steven. Lehotay, Kyun Son, Hyeyoung Kwon, Urairat Koesukkiwat, Wusheng Fu, Katerina Mastovska, Eunha Hoh, Natchanun Leepipatpiboon **Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in**



---

---

**fruits and vegetables**, Julio 2010, Journal of Chromatography, 1217 (16), Págs 254–256.

[14] F. Schenck y J Hobbs **Evaluation of the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) Approach to pesticide analysis**. Abril 2004, Bulletin of Environmental and Contamination Toxicology, 73(1), págs. 24-30.

[15] D. Roberts, L. Laughlin, P. Hsueh, y J. Legters **DDT, global strategies, and a malaria control crisis in South America**. Octubre 1997, Emerging Infectious Diseases; 3(3), págs 295–302.

[16] United States Department of Agriculture (USDA) [Página de Internet] **Consumer Report Pesticides in fruits and Vegetables How to eat Wealthy**, (consultado mayo 2012) disponible desde: <http://www.safefruitsandveggies.com>

[17] Yanjun Zhang, Navindra Zeeram, Rupo Lee, Lydia Feng, Heber David **Isolation and Identification of Strawberry Phenolics with Antioxidant and Human Cancer Cell Antiproliferative Properties**. Abril 2008, Journal Of Agriculture Food and Chemistry, 56 (3), págs 670 – 675.

[18] Sandra M Nahumm **Potential Impact of Strawberries in human health: a review of the science**. 2004, Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 44(1) Págs 1-17.

[19] Rada Durovic y Tijana Dordevic **Modern extraction techniques for pesticides residues determination in plants and soil samples** [Bibliografía] Institute of Pesticides and Environmental Protection, Referencia: 2001 (Belgrado, Serbia) 352p

[20] Programa de Naciones Unidas para el medio ambiente PNUMA **Guía para el análisis de contaminantes orgánicos persistentes** [Bibliografía] PNUMA (Estados Unidos de America) referencia: 2007, 24p.



---

[21] Diccionario de la Real Academia Española [Página de Internet] **Diccionario DRAE en línea** consultado marzo 2012 disponible desde: [http://buscon.rae.es/draeI/SrvltConsulta?TIPO\\_BUS=3&LEMA=pesticida](http://buscon.rae.es/draeI/SrvltConsulta?TIPO_BUS=3&LEMA=pesticida).

[22] Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura [página de internet] **Codex Alimentarius**. consultado abril 2012, disponible desde: <http://www.codexalimentarius.net/web/jmpr.jsp>

[23] Comisión Venezolana de Normas Industriales **Norma Venezolana COVENIN 1106:1995 plaguicidas y su clasificación** [Bibliografía] Asociación Venezolana de la Industria Química y Petroquímica ASOQUIM (Caracas, Venezuela) referencia: 1995 27p.

[24] Comisión Venezolana de Normas Industriales **Norma Venezolana COVENIN 2846-93 Plaguicidas, Evaluación toxicológica** [Bibliografía] Publicaciones fondonorma (Caracas, Venezuela) referencia: 1993 13p.

[25] Evans Peter, y Evans Helen [página de internet] **DDT saved lives** consultado abril 2012 disponible desde: <http://www.renewamerica.com/columns/evans/031230>

[26] Kenneth D Katz, **Organophosphate toxicity** [Bibliografía], Pinsky Michael: Editor en jefe. University of Pittsburgh Medical Center; Pittsburgh Poison Center (Pittsburgh, Estados Unidos de America) referencia: **2012**. 267p.

[27] F. McEwen, G. Stephenson **The use and significance of pesticides in the environment**. [Bibliografía] (Nueva York, Estados Unidos de America): referencia 1979. 538p.

[28] M. Weichbrodt, W. Vetter, y B. Lucas, **Microwaved-assisted extraction and accelerated solvent extraction with ethyl acetate-cyclohexane before determination of organochlorines in fish tissue by gas chromatography with electron-capture detection**. Agosto 2000, *Journal of AOAC Int.* 83, págs 1334 -1338.



- 
- [29] L. Wennrich, P. Popp, G. Koeller, y J. Breuste, **Determination of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in strawberries by using accelerated solvent extraction combined with sorptive enrichment and gas chromatography/mass spectrometry.** Enero 2001, *Journal of AOAC Int.* 84(1), págs 1194-1201.
- [30] S. Lehotay, y A. Valverde, **Evaluation of different solid-phase traps for automated collection and clean-up in the analysis of multiple pesticides in fruits and vegetables after supercritical fluid extraction.** Marzo 1997, *Journal of Chromatography. A.* 765(1) , págs 69-84.
- [31] R. Argauer, K. Eller, M. Ibrahim, y R. Brown, (1995) **Determining propoxur and other carbamates in meat using HPLC fluorescence and gas chromatography/ion trap mass spectrometry after supercritical fluid extraction,** Octubre 1995, *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 43(10), págs 774-786.
- [32] T. José, S.B. Consuelo, A. Beatriz, y G. Lorena, **Analysis of pesticide residues in juice and beverages.** Septiembre 2004, *Critical Reviews in Analytical Chemistry.* 34(1), pág. 147-164.
- [33] D. Lambropoulou, y T. Albanis, **Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review.** Noviembre 2007, *Analytical and Bioanalytical. Chemistry,* 389(6), págs 1663-1683.
- [34] Simplicio, A.L. y Boas, L.V. **Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice.** Febrero 1999, *Journal of Chromatography.* 833(1), págs 35-42.
- [35] H. Berrada, G. Font, y J. Molto, **Application of solid-phase microextraction for determining phenylurea herbicides and their homologous anilines from vegetables.** Julio 2004, *Journal of Chromatography.* 1042(1-2) , págs 9-14.



- 
- [36] Barriada-Pereira, M., González-Castro, M.J., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada, D., y Fernández-Fernández, E. **Determination of organochlorine pesticides in horticultural samples by microwave assisted extraction followed by GCECD.** 2005, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 85(2), págs 325-333.
- [37] Bouaid, A., Martín Esteban, A., Fernández, P. y Cámara, C. **Microwave assisted extraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in oranges by gas chromatography.** Junio 2000, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 367(3), págs 291-294.
- [38] M. Anastassiades, S. Lehotay, D. Stanjnbaheer, y F. Schenck, **Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce.** Abril 2003, *Journal of AOAC Int.* 86(2), págs 412-431.
- [39] K. Banerjee, D. Oulkar, S. Dasgupta, S. Patil, R. Savant, y P. Adsule, **Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Noviembre 2008, *Journal of Chromatography. A* 1173(1-2), págs 98-109.
- [40] T. Nguyen, J. Yu, D. Lee, y G. Lee **A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS samplepreparation method and gas chromatography mass spectrometry.** Septiembre 2008, *Food Chemistry.* 110(1), págs 207-214.
- [41] Instituto Nacional de Estadística, [página de internet] **Proyecciones de población con base Censo 2001, Estado Aragua, Municipio Tovar.** consultado mayo 2012. Disponible desde: <http://www.ine.gov.ve/seccion/poblacion/>



- 
- [42] S. Kris Bandal **The pesticide chemist and modern toxicology** [Bibliografía] American Chemical Society Division of pesticide Chemistry (Washington DC, Estados Unidos de América) referencia 1980 303p.
- [43] D. Abel **Diseño estadístico de experimentos** [Bibliografía] Editorial Universidad de Antioquia 1999 ISBN: 9587142640 primera edición p. 346.
- [44] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO [página de internet] **Límites Máximos Residuales según Codex Alimentarius**, consultado Julio 2012, disponible desde: [http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/MRLs\\_Spices\\_s.html](http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/MRLs_Spices_s.html)
- [45] National Pesticide Information Center, [Página de internet], **Maxim Limits Residues EPA**, consultado Julio 2012, disponible desde: <http://npic.orst.edu/reg/tolerance.html>
- [46] EU Pesticides de database [Página de internet], **Pesticide EU-MRLs**, consultado Julio 2012, disponible desde: [http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/index.cfm?event=homepage&CFID=7395599&CFTOKEN=90799cc0f0522027-C68F04ED-D788-7F5C-C572F41FAA35EFB9&jsessionid=24053fdb859357354e49TR](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=homepage&CFID=7395599&CFTOKEN=90799cc0f0522027-C68F04ED-D788-7F5C-C572F41FAA35EFB9&jsessionid=24053fdb859357354e49TR)
- [47] Planigestión C.A, **Listado de legislación Ambiental Venezolana** [Bibliografía] Fundación Planigestión (Caracas, Venezuela), referencia: 2011, disponible desde: consultoría Planigestión.
- [48] Pylypiw Harry, Arsenault Terri, Thetford Christine, Mattina Mary **Suitability of microwave assisted extraction for multiresidue pesticides analysis of produce**, Octubre 1997, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 45(1), págs 3522-3528.
- [49] S. Lehotay, K. André, H. Maurice, y V. Peter **Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables**



---

---

**using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection**, Mayo 2005, Journal of AOAC International, 88(2), págs 525-614.

[50] Plaza Patricia, Fernández José, Shtereva Deyana, Frenich Antonia y Vidal José **Development and validation of a multiresidue method for the analysis of 151 pesticides residues in strawberry by gas Chromatography coupled to a triple quadropole mass analyzer**, Mayo 2007, Rapid Communications in mass spectrometric, 21(1) págs 2282-2294.

[51] Guan Hat Tuan y Mee-Kin Chai **Sample preparation in the analysis of pesticides residue in food by chromatographic techniques**, **Pesticides – Strategies for pesticides analysis**, [Bibliografía] editora Margarita Stoycheva, referencia: 2010, Intech Corporation, (Rijeka, Croacia) ISBN 978-953-307-460-3 p. 27-58.

[52] Izquierdo Pedro, Allara María, Torres Gabriel, García Aiza y Piñero María **Residuos de pesticidas organoclorados en formulas infantiles**, Junio 2004, Revista Científica FCV-LUZ, 12( 2), págs 147-152.

[53] Pierre Francis y Betancourt Pedro **Residuos de plaguicidas organoclorados y organofosforados en el cultivo de cebolla en la depresión de Quíbor, Venezuela**. Marzo 2007, Revista Bioagro, 19(2) págs 69-78.

[54] G. Ettiene, S. Ortega, D. Medina, J. Sepulveda y L. Sandoval **Optimización y validación de un método de extracción y limpieza en fase sólida para la determinación de insecticidas organofosforados en cebollín (*Allium fistulosum* L.) y cilantro (*Coriandrum sativum* L.)**. Septiembre 2008, Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ) ISSN 0378-7818. 25(3), págs 550-569.

[55] Statpoint technologies inc. **Statgraphics ® versión 16.2 32bits**, [programa de computadora]. requerimientos del sistema Pentium IV 500MHZ o superior; 2 GB RAM; soporta cualquier versión de Windows XP, Windows ME, Windows 2000, Windows vista y Windows 7, disponible versión de 64 bits.



---

[56] Salas Janeth, Benzo Zully, Rodriguez Leonardo **diseño factorial para la optimización de las condiciones experimentales para la determinación de Rutenio por espectroscopía de absorción atómica por llama** [Trabajo Especial de Grado] mayo 1995 Universidad del Zulia.

[57] Thompson, Michael; Ellison, Steven; Fajgel, Aleo; Willett, Paul y Wood, Roger **Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement**, International Union of Pure and Applied Chemistry IUPAC, Septiembre 1996, reporte técnico IUPAC/ISO/AOAC INTERNATIONAL/EUROCHEM como resultado del symposium on harmonization of quality assurance, Orlando, USA.

[58] Francesca Giampieri, Sara Tulipani, José Alvarez-Suarez, José Quiles, Bruno Mezzetti, Mauricio Battino **The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health** Agosto 2012, Nutrition Journal 28(1), págs 9-19.



---

---

## 11) APENDICE

En esta sección se presenta las ecuaciones que se emplearon para los análisis de los datos, así como para los análisis estadísticos. Las pruebas estadísticas se basaron en el diseño de experimento por análisis factorial el cual fue hecho directamente por el software Statgraphics, las otras pruebas son pruebas tipo contraste de significación específicamente la prueba F de Fisher y la prueba t de Student.

**Prueba F de Fisher:** Es una prueba de comparación de varianzas de dos poblaciones, esta prueba tiene como fin determinar si no hay diferencias significativas entre los valores de las varianzas de dos poblaciones aplicando la siguiente ecuación

$$F_{\text{exp}} = \frac{(s_{y1})^2}{(s_{y2})^2}$$

El valor aquí obtenido denominado F experimental o F crítica se compara con un valor de F tabulado conocido también como F crítico, este valor de F depende de los grados de libertad que se tengan y el nivel de confianza establecido. Se establece hipótesis de comparación principalmente la hipótesis nula que dice que no hay diferencia entre las varianzas de las dos poblaciones  $H_0: S_1^2 = S_2^2$  si la  $F_{\text{cal}} < F_{\text{cr}}$  se acepta esta hipótesis en caso contrario se rechaza.

**Prueba t de Student:** esta prueba sirve para determinar si dos medias de diferentes poblaciones son estadísticamente iguales, para ello es necesario saber con anterioridad si los valores de sus varianzas son iguales o diferentes, para el primer caso donde las variables son iguales el valor de t experimental se calcula a través de la siguiente ecuación

$$t_{\text{exp}} = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{s_y \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

En el caso que las varianzas no sean iguales el valor de t experimental se calcula a través de

$$t_{\text{exp}} = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{s_y \sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

Donde s se obtiene como

$$s_y = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

El valor de t experimental obtenido se compara con el t tabulado o t crítico este nuevamente depende de los grados de libertad y el nivel de confianza establecido,. Se establece como hipótesis nula  $H_0: X_1=X_2$  si la  $t_{\text{cal}} < t_{\text{crí}}$  se acepta esta hipótesis en caso contrario se rechaza

Los parámetros analíticos de precisión calculados para los métodos de extracción son la desviación estándar (S), desviación estándar relativa (RSD), el coeficiente de variación (CV), la varianza ( $S^2$ ) y la dispersión.



**Desviación estándar:**

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

**Desviación estándar relativa:**  $RSD = \frac{s}{\bar{x}}$

**Coeficiente de variación:**  $CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$

**Varianza:**  $Varianza = s^2$

**Dispersión:**  $Dispersión = Mayorvalor - Menorvalor$

Los parámetros analíticos de exactitud calculados para los métodos de extracción son el porcentaje de recuperación (%R) el error absoluto (Ea) y el error relativo (Er)

**Porcentaje de Recuperación:**  $\% R = \frac{C_{bya} - C_b}{C_s} \times 100$

C<sub>bya</sub>= cantidad de analito en la muestra + cantidad de analito añadido

C<sub>b</sub>= cantidad de analito en un blanco de muestra

C<sub>s</sub>= concentración esperada



**Error absoluto:**  $E_a = \text{Valoragregado} - \text{Valorrecuperado}$

**Error relativo:**  $E_r = \frac{\text{Valoragregado} - \text{Valorrecuperado}}{\text{Valoragregado}}$

Los parámetros analíticos de calidad instrumental calculados son límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), límite de linealidad (LOL), rango lineal, rango dinámico y sensibilidad.

**Límite de detección:**  $LOD = Y_0 + 3SB$

**Límite de cuantificación:**  $LOQ = Y_0 + 10SB$

**Sensibilidad:** representa el cambio en la señal analítica por el correspondiente cambio en la concentración del analito y se determina de la siguiente forma:

Sensibilidad = pendiente

Sensibilidad analítica = Pendiente / Ruido

$g = \text{SEN} / s_y$  (Unidades: concentración<sup>-1</sup>)

donde el ruido se determina como:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{p=1}^P \sum_{r=1}^R (y_{pr} - \bar{y}_p)^2}{M - P}}$$



donde M= número total de puntos, P= número de niveles, R= número de replicas para cada nivel  $\bar{Y}_p$ = señal promedio  $Y_p$ = señal individual

por tanto la inversa de la señal analítica queda como:

$$\gamma^{-1} = s_y / \text{SEN}$$

Representa la diferencia mínima detectable en unidades de concentración.