

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

“OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS Y ORGANOFOSFORADOS EN MUESTRAS DE QUINOA DE DIFERENTE PROCEDENCIA EMPLEANDO LA CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADA A LA ESPECTROMETRIA DE MASAS GC-MS”

Trabajo Especial de Grado presentado ante
La ilustre Universidad Central de Venezuela
Por la Br. Bárbara Torres, para optar al título
De Licenciado en Química.

Caracas, Abril de 2019.

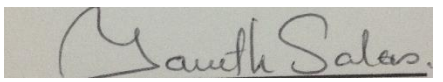
Yo, Profesora Rosa Amaro investigadora del Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y yo Msc. Janeth Salas investigadora del Centro de Química del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas .

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

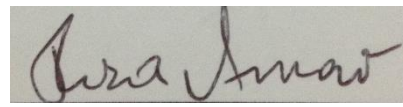
“OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOCORADOS Y ORGANOFOSFORADOS EN MUESTRAS DE QUINOA DE DIFERENTE PROCEDENCIA EMPLEANDO LA CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADA A LA ESPECTROMETRIA DE MASAS GC-MS”

Que presenta el Br. Torres López Bárbara Carolina, para aspirar al título de Licenciado de Química, se está realizando en el Laboratorio de Espectrometría de Masas del Centro de Química del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), bajo nuestra dirección durante los años 2017 y 2018, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, febrero de 2019.

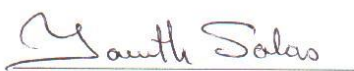


Msc. Janeth Salas (Tutor)

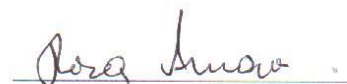


Dra. Rosa Amaro (Tutor)

“OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOCORADOS Y ORGANOFOSFORADOS EN MUESTRAS DE QUINOA DE DIFERENTE PROCEDENCIA EMPLEANDO LA CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADA A LA ESPECTROMETRIA DE MASAS GC-MS” . Presentado por el Br. Bárbara Carolina Torres López, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.



Msc. Janeth Salas (Tutor)



Dra. Rosa Amaro (Tutor)



Profa. Mariela Rincón (Jurado)



Prof. Jaime Valls (Jurado)

RESUMEN

Los pesticidas son sustancias utilizadas para combatir cualquier plaga o especie indeseada en plantas o animales [1], estos pueden ser tóxicos y peligrosos si se emplean de manera inadecuada, también son considerados alguno de ellos persistente en los medios o sembradíos donde son aplicados. En la actualidad, es de gran importancia la determinación de pesticidas en matrices de alimentos para su consumo seguro, ya que los mismos son fundamentales para el desarrollo humano.

Estudios realizados han determinado que los pesticidas pueden estar presentes en pequeñas cantidades en muchos alimentos, incluyendo algunos de origen orgánico. El tratamiento de la muestra es una de las etapas determinantes para la evaluación de este tipo de compuestos a niveles de trazas, por lo que en este trabajo de investigación se optimizó un método de extracción multiresiduo para la determinación simultánea de pesticidas organoclorados y organofosforados en muestras de quinoa comercial de procedencia ecuatoriana y venezolana usando la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas. La influencia del tamaño de partícula fue considerada para ver su efecto en el proceso de extracción de los pesticidas evaluados. El método de extracción en fase sólida QuEChERS fue usado para la determinación de los pesticidas Heptacloro, Aldrin, Epoxyheptacloro, Dieldrin, Diazinón, Malation, Fenitrotión, Etilparatión y Etión en dichas muestras.

Los parámetros analíticos fueron evaluados obteniéndose valores para el ajuste lineal de cada curva de calibración para cada pesticida estudiado de $R^2 > 0,9910$ con excepción de epoxyheptacloro cis. Los límites de detección variaron entre 0,00013 hasta 0,01819 mg/Kg; mientras que los límites de cuantificación se determinaron en un rango entre los 0,00018 y 0,04416 mg/Kg.

El método QuEChERS para la extracción y determinación de cada pesticida para las dos concentraciones de trabajo mostró porcentajes de recuperación para los organoclorados en un rango de 33 – 79 % para la concentración de 0,01 mg/Kg y entre 72 - 91 % en una concentración de 0,10 mg/Kg; para los pesticidas organofosforados se tuvo recuperaciones entre 44 – 71 % al trabajar a una concentración de 0,01 mg/Kg y entre 79 - 94 % para la concentración máxima de 0,10 mg/Kg. Estos valores de rango comprenden los 10 pesticidas estudiados.

En el estudio de la influencia del tamaño de partícula se observó que a mayor tiempo de molienda el tamaño de partícula disminuye y la eficiencia en la extracción aumenta.

Se analizaron las muestras venezolanas y ecuatorianas observándose la no presencia de los pesticidas estudiados en las muestras evaluadas.

Palabras Claves: quinoa, pesticida organoclorado, pesticida organofosforado, QuEChERS, Cromatografía de Gases, Espectrometría de Masas.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi hijo **Fabián Nicolás**, por darme la dicha de ser madre, de enseñarme muchas cosas y por traer mucha alegría a mi vida e impulsarme a llevar a cabo este camino. ¡Todo lo hago por ti!

Agradezco primeramente a Dios, a la virgen, a mis Padres y Hermana, sin su apoyo en el largo camino que me llevó el terminar la carrera no hubiese sido posible, miles de gracias.

Quiero agradecer al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC por complementar mi formación como profesional y por permitirme la realización de este Trabajo.

A mis tutoras, Profesora y Dra. Rosa Amaro del Centro de Química Analítica de la UCV por brindarme este proyecto de investigación, por su asesoría y colaboración en el mismo y a Msc. Janeth Salas del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC por permitirme realizar mi proyecto de investigación en Laboratorio de Espectrometría de Masas del Centro de Química de dicha institución, por tu gran apoyo, por levantarme el ánimo y por siempre esas palabras sabias dadas ante cualquier situación, por siempre mostrar disposición y ayuda las veces que lo necesite y por brindarme sus conocimientos y consejos para la realización de este proyecto. ¡MILES DE GRACIAS!

Igualmente al Personal del Centro de Química del IVIC a Teresa Gonzáles, Iraida Díaz, Brenda Gutiérrez , Ángela Sifontes, Edgar Catarí, Damarys Soto por su valiosa colaboración en la logística para llevar a cabo el procedimiento experimental de este trabajo de investigación.

Al Lic. Carlos Ibarra y al Lic. Irán González del Laboratorio de Bioanalítica del centro de Estudios Especializados en Química Medicinal, por su invaluable colaboración en el análisis de las muestras tratadas mediante la técnica de Cromatografía GC-MS.

A Joseba Echevarrieta del Laboratorio de Materiales del Centro de Ingeniería de los Materiales y Nanotecnología del IVIC, por su importante colaboración en el análisis microestructural de las muestras.

Y finalmente un agradecimiento especial a Rafael Vitelli y a Eunice Marcano por proporcionarnos la muestras de quinoa tanto ecuatoriana como venezolana para la realización de este proyecto de investigación.

INDICE

1) INTRODUCCION	1
2) JUSTIFICACIÓN	4
3) REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. QUINOA	6
3.1.1. <i>Origen y Composición Nutricional</i>	6
3.1.2. <i>Variedades de quinoa</i>	9
3.1.3 <i>Importancia económica</i>	10
3.2. PESTICIDAS	11
3.2.1. <i>Residuos de Pesticidas</i>	12
3.2.2 <i>Clasificación</i>	12
3.2.3 <i>Propiedades y características de los pesticidas organoclorados y organofosforados:</i>	15
3.2.3.1) Pesticidas organoclorados:.....	15
3.2.3.2) Pesticidas organofosforados:.....	21
3.2.4 <i>Comparación de los pesticidas organoclorados y organofosforados:</i>	27
3.2.5 <i>Uso de pesticidas en cultivos de quinoa:</i>	28
3.3) <i>Análisis de agrotóxicos en alimentos:</i>	30
3.4) EXTRACCIÓN DE PESTICIDAS:	31
3.5) MÉTODOS DE EXTRACCIÓN:	32
3.6) MÉTODOS DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DISPERSIVA, MÉTODO QUECHERS:.....	33
3.7) MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PESTICIDAS:	35
3.7.1) <i>Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS):</i>	36
3.8) MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO PARA EL ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE LAS MUESTRAS	37
3.9) PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA LA ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO	39
4) ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	43
5) OBJETIVOS	47
5.1) OBJETIVO GENERAL:.....	47
5.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	47
6) METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	48

6.1) INSTRUMENTACIÓN Y ACCESORIOS	48
6.1.1) <i>Instrumentación</i>	48
6.1.2) <i>Accesorios:</i>	49
6.2) REACTIVOS:	49
6.3) MUESTRAS UTILIZADAS:	50
6.4) TRATAMIENTO DE LA MUESTRA:	50
6.4.1) <i>Pre-tratamiento de la muestra</i>	50
6.5) PREPARACIÓN DE PATRONES Y CURVA DE CALIBRACIÓN:	51
6.6) TRATAMIENTO O FORTIFICACIÓN DE LA MUESTRA:	52
6.7) MÉTODO DE EXTRACCIÓN QUECHERS:	52
6.8) ESTUDIO DE RECUPERACIÓN DE LOS PESTICIDAS	53
6.9) ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS DE LAS MUESTRAS.	54
7) RESULTADOS Y DISCUSIONES:	56
.....	56
8) CONCLUSIONES:	81
9) RECOMENDACIONES:	83
10) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	84
11) ANEXOS	90
1. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS PESTICIDAS ORGANOCORADOS Y ORGANOFOSFORADOS ANALIZADOS.	90
2. MODELO DE CÁLCULO PARA LA OBTENCIÓN DE CADA PESTICIDA ORGANOCORADO Y ORGANOFOSFORADO ANALIZADO. USANDO COMO EJEMPLO EL CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DEL PESTICIDA DIAZINÓN.	94

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional de la quinoa.....	7
Tabla 2. Contenido de aminoácidos presentes en la quinoa.....	8
Tabla 3. Clasificación de los pesticidas según su toxicidad.....	13
Tabla 4. Principales grupos de pesticidas organoclorados.....	16
Tabla 5. Persistencia de pesticidas organoclorados y su factor de bioacumulación.....	17
Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas del aldrin y dieldrin.....	19
Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas del heptacloro.....	20
Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas del epoxyheptacloro.....	21
Tabla 9. Principales grupos de pesticidas organofosforados.....	22
Tabla 10. Propiedades fisicoquímicas del diazinón.....	23
Tabla 11. Propiedades fisicoquímicas del etión.....	24
Tabla 12. Propiedades fisicoquímicas del malatión.....	25
Tabla 13. Propiedades fisicoquímicas del fenitrotión.....	26
Tabla 14. Propiedades fisicoquímicas del etilparatión.....	27
Tabla 15. Tabla comparativa entre los pesticidas organoclorados y organofosforados.....	27
Tabla 16. Límites máximos permitidos de pesticidas organofosforados y organoclorados en algunos cereales y granos establecidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura FAO.....	29
Tabla 17. Parámetros considerados en la molienda de las muestras de quinoa cultivada en Ecuador y Venezuela.....	51
Tabla 18. Programa térmico del horno cromatográfico para la separación de los pesticidas.....	54
Tabla 19. Tiempo de retención para los pesticidas estudiados.....	59
Tabla 20. Límites de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).....	60
Tabla 21. Coeficientes de correlación R de los pesticidas estudiados.....	61
Tabla 22. Porcentajes de recuperación para los pesticidas organoclorados y organofosforados para las condiciones experimentales.....	66

Tabla 23. Análisis de varianza de un factor para los pesticidas organoclorados y organofosforados con un tamaño de partícula de 1,20 m (t=15 minutos)	68
Tabla 24. Análisis de varianza de un factor para los pesticidas organoclorados y organofosforados con un tamaño de partícula de 0,88 m (t= 30 minutos)	70
Tabla 25. Porcentajes de recuperación bajo las mejores condiciones de extracción para los pesticidas organoclorados.	72
Tabla 26. Porcentaje de recuperación bajo las mejores condiciones de extracción para los pesticidas organofosforados.	72
Tabla 27. Porcentajes de recuperación bajo las condiciones menos favorables de extracción para los pesticidas organoclorados.	73
Tabla 28. Porcentajes de recuperación bajo las condiciones menos favorables de extracción para los pesticidas organofosforados.....	74
Tabla 29. Tabla de iones moleculares y espectro de masas de cada pesticida estudiado.	96

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del proceso de extracción QuEChERS.....	53
Figura 2. Programa térmico del horno cromatográfico para la separación de los pesticidas.	55
Figura 3. Microscopía Electrónica de Barrido para muestras de quinoa molidas a 15 minutis (A) y a 30 minutos (B).	57
Figura 4. Orden de elución y tiempos de retención para la mezcla de pesticidas organofosforados (A), ampliación para organoclorados (B) en el estudio para las muestras de quinoa.....	59
Figura 5. Muestra de quinoa ecuatoriana sin agregado de pesticidas.....	64
Figura 6. Muestra de quinoa ecuatoriana extraída con QuEChERS y enriquecida con una mezcla de pesticidas de 0,30 ppm POC y 0,10 ppm POP.	64
Figura 7. Extracción QuEChERS para la muestra de quinoa ecuatoriana.....	76
Figura 8. Extracción QuEChERS para la muestra de quinoa venezolana.	76
Figura 9. Muestra ecuatoriana fortificada con pesticidas y extraída por QuEChERS. ...	77

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva de calibración del compuesto Diazinón.	90
Gráfico 2. Curva de calibración del compuesto heptacloro.	90
Gráfico 3. Curva de calibración del compuesto Aldrin.....	91
Gráfico 4. Curva de calibración del compuesto Malatión.....	91
Gráfico 5. Curva de calibración del compuesto Fenitotrión.	91
Gráfico 6. Curva de calibración del compuesto Etilparatión.	92
Gráfico 7. Curva de calibración del compuesto Epoxyheptacloro Cis.	92
Gráfico 8. Curva de calibración del compuesto Epoxyheptacloro Trans.	92
Gráfico 9. Curva de calibración del compuesto Dieldrin.	93
Gráfico 10. Curva de calibración del compuesto Etión.	93

1) INTRODUCCION

A lo largo de la historia, el hombre se ha caracterizado por modificar y aprovechar los recursos que le rodean, con la finalidad no sólo de asegurar su supervivencia, sino también el de mejorar su calidad de vida. Uno de los recursos que se buscan aprovechar al máximo, son aquellos relacionados con la alimentación; puesto que son necesarios para mantener en funcionamiento los diversos procesos fisiológicos que ocurren en el cuerpo humano.

Los recursos utilizados en la alimentación humana pueden clasificarse en dos grandes grupos, aquellos de origen vegetal y otro de origen animal. Entre los alimentos de origen vegetal, los cereales constituyen uno de los alimentos más importantes de la dieta humana debido a sus altas cualidades nutricionales. La quinoa (*Chenopodium Quinoa Wild*) es considerada un pseudo-cereal ya que provee la mayor parte de sus calorías en forma de hidratos complejos, contiene mucha más grasas y proteínas que la mayoría de los cereales, es conocida por su alto aporte de fibra y en cuanto a los micronutrientes es una gran fuente de potasio, magnesio, calcio, fósforo, hierro y zinc así como también ofrece vitaminas de complejo B y vitamina E. [2]

La quinoa es una planta andina que se originó en los alrededores del lago Titicaca de Perú y Bolivia; fue cultivada y utilizada por las civilizaciones prehispánicas y reemplazada por los cereales a la llegada de los españoles, a pesar de constituir un alimento básico de la población de ese entonces. En países productores como Bolivia se indica que la evolución del crecimiento en cuanto a la producción de la quinoa se da entre los años 2000 hasta 2015, estos datos se obtienen por los informes anuales que arroja el Censo Nacional Agropecuario para el año 2015 y los organismos competentes como

el Ministerio de Agricultura, Ministerio de Producción, Ministerio de Agricultura, Ministerio de la Producción, Ministerio de Comercio Exterior de este país, donde se observa el incremento del cereal por más de un 500% durante estos años. [3]

Por otro lado, son numerosas las tecnologías creadas por el hombre que permiten no sólo obtener productos de una considerable calidad, sino que también permiten acelerar la producción alimentaria de estos rubros. En el caso de la agricultura, se utilizan tecnologías de riego que permitan un mayor aprovechamiento de las áreas destinadas a tal actividad. De igual manera, se emplean compuestos de origen orgánico e inorgánico que permitan acelerar el crecimiento de los recursos agrícolas. Además de esto, dependiendo de las regulaciones del país donde se lleve a cabo la actividad agrícola, es posible utilizar modificaciones genéticas de las especies, para así mejorar la producción y fortalecer las debilidades que pueda tener el cultivo a explotar. La protección de cultivos juega un papel de gran importancia en la producción de alimentos a nivel mundial. Una de las formas de protección más utilizada en la agricultura ha sido el uso de agroquímicos, en respuesta a la creciente demanda de alimentos, al incremento constante de la población y a la limitada área de terreno cultivable disponible

Pues si bien se hace necesario el control de las especies dañinas, las sustancias o compuestos empleados con tal fin, pueden resultar tóxicos para el consumo humano, resultando así necesario determinar la cantidad de estos químicos que pueda quedar remanente en los cultivos agrícolas.

Las sustancias mencionadas con anterioridad reciben el nombre de pesticidas o plaguicidas. La clasificación de las mismas se hace en función a su toxicidad,

composición química, actividad contra plagas y su destino de aplicación. Dentro de estas categorías destacan los pesticidas organoclorados y organofosforados.

Vale acotar que la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el año de 1953 empezó a reconocer los problemas de salud pública ocasionados por el incremento en el uso de pesticidas en la industria de alimentos. Es así como se tomaron medidas en la disminución del uso de estas sustancias químicas por parte de la OMS y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés); esto con la finalidad de limitar la presencia de dichas sustancias en los alimentos y desarrollar pesticidas que fueran amigables con el medio ambiente y con la salud de las personas. [4]

La industria emplea técnicas químicas, especialmente aquellas basadas en la analítica instrumental para determinar tanto la presencia como la cantidad de las moléculas que constituyen el principio activo de los productos usados como pesticidas. Dentro de estas técnicas se encuentra la Cromatografía de Gases que es utilizada con técnicas como la Espectrometría de Masas, ya que permite la identificación y cuantificación de las especies de interés.

Por tanto, se busca llevar a cabo la determinación de compuestos organoclorados y organofosforados presentes en muestra de quinoa comerciales de diferentes procedencias, empleando la técnica de extracción en fase sólida (método QuEChERS), posteriormente se empleará la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) para la identificación y posterior cuantificación de los pesticidas presentes en las muestras analizadas.

2) JUSTIFICACIÓN

Con el incremento exponencial de la población mundial, el hombre ha necesitado más alimento; por ello se ha apoyado en la agroquímica como una de sus principales herramientas para el aumento en la producción de alimento, con el desarrollo de tecnologías con tendencia a obtener un mayor rendimiento y mejora sustancial en los cultivos. Una de las problemáticas de los agricultores a la hora de obtener buenas cosechas es la aparición de plagas que producen las pérdidas de cultivos, por esto se ha buscado la manera de erradicarlas, utilizando los pesticidas. El uso intensivo y generalizado de estas sustancias ha creado varios problemas relacionados con la salud pública y el desequilibrio del sistema, incluyendo el envenenamiento de los agricultores, la contaminación de los alimentos y del ambiente [5].

A pesar de la preocupación por el control de residuos de pesticidas en los alimentos, se requiere que los métodos de análisis aplicados pueden lograr resultados de alta calidad para una amplia gama de pesticidas [6].

La quinoa es un grano andino de alto valor nutritivo, de suma importancia en la dieta de los pobladores andinos, que en la actualidad viene siendo exportado a mercados internacionales como el de Estados Unidos y Europa. A pesar de la preocupación por el control de residuos de pesticidas en los alimentos, algunos métodos de análisis pueden lograr resultados de alta calidad para una amplia gama de pesticidas [7]. Es importante resaltar que aunque ha existido una rápida evolución sobre la exportación de quinoa proveniente de Perú y Bolivia, desde el año 2104 hasta el 2016 en el mercado norteamericano; posterior al año 2016 la exportación de quinoa ha decaído debido a que se detectaron residuos de pesticidas y como en dicho país los órganos oficiales (FDA-USDA) aún no han determinado a la fecha los contenidos máximos de residuos de plaguicidas permisibles para su consumo, no puede ingresar quinoa con alguna traza

aunque sea marginal de residuos de plaguicidas, por lo que se han re direccionados a otros mercados con menor control como Europa y otros países de Latinoamérica [8].

Debido al uso que tienen a nivel nacional y mundial los pesticidas, se han desarrollado numerosos métodos para extraer los mismos en alimentos, el método QuEChERS se aplica para la determinación de estos residuos debido a las ventajas que ofrece. Este método ha sido modificado en los últimos años por diversos autores para mejorar la eficiencia en la determinación de algunos pesticidas y se ha hecho estudios sobre la influencia del tamaño de partícula sobre la recuperación y determinación de estos compuestos, por lo que es importante optimizar los parámetros de obtención del tamaño de partícula y verificar su influencia al aplicar el método QuEChERS, también es importante verificar los niveles máximos de pesticidas en muestras de quinoa de diferentes procedencias; así como también determinar los residuos de estos contaminantes orgánicos en muestras de quinoa venezolana.

3) REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Quinoa

3.1.1. Origen y Composición Nutricional

La quinoa (*Chenopodium Quinoa Wild*) es una planta andina que se originó en los alrededores del lago Titicaca de Perú y Bolivia; fue cultivada y utilizada por las civilizaciones prehispánicas y reemplazada por los cereales a la llegada de los españoles, a pesar de constituir un alimento básico de la población de ese entonces.

La evidencia histórica disponible señala que su domesticación por los pueblos de América puede haber ocurrido entre los años 3.000 y 5.000 antes de Cristo. Existen hallazgos arqueológicos de quinoa en tumbas de Tarapacá, Calama y Arica, en Chile, y en diferentes regiones del Perú. A la llegada de los españoles, la Quinoa tenía un desarrollo tecnológico apropiado y una amplia distribución en el territorio Inca y fuera de él. [2]

La planta tiene un tiempo de crecimiento de 90 a 220 días, dependiendo de cada variedad, y puede llegar a producir entre 3 y 5 toneladas por hectárea (Tm/Ha) de grano. También se obtiene cerca de 4Tm/Ha de materia seca con un contenido de 18% de proteínas, que le da un potencial como planta forrajera [7], Los estudios de la quinua han llevado al descubrimiento de que este grano tiene un valor nutricional muy alto, contiene proteínas de alta calidad, bajo contenido en sodio, alto contenido de minerales, tales como calcio, fósforo, magnesio, potasio, hierro, cobre, manganeso, zinc y cantidades significativas de importantes

aminoácidos, especialmente lisina, vital para el crecimiento y reparación de tejidos. En la tabla 2 se muestra la composición nutricional de la quinoa:

Tabla 1. Composición nutricional de la quinoa

Componentes	Contenido por cada 100 g de Quinoa
Calorías	351
Humedad	9.40 – 13.0 %
Carbohidratos	53.50 – 74.30 g
Fibra	2.10 – 4.90 g
Grasa total	5.30 – 6.40 g
Lisina	6.80 – 8.50 g
Proteínas	11.00 – 21.30 g
Metionina	2,1 mg
Treonina	4.5 mg
Triptófano	1.3 mg

Fuente: U. Bracco, Nestlé Research Centre. 1997. [8]

La quinoa es el cereal de mayor y más completa composición en aminoácidos que existen sobre el planeta. Contiene los 20 aminoácidos (incluyendo los 10 esenciales), posee el 40% más de Lisina que la leche de allí su calificativo de Súper cereal. A continuación en la tabla #2 se muestra el contenido de los aminoácidos presentes en la quinoa: [7]

Tabla 2. Contenido de aminoácidos presentes en la quinoa

Aminoácidos esenciales (en la alimentación humana)	Quinoa (g aminoácido / 100 g proteína)
Histidina	3.2
Isoleucina	4.4
Leucina	6.6
Lisina	6.1
Metionina + cistina	4.8
Fenilalanina + tirosina	7.3
Treonina	3.8
Valina	4.5
Alanina	4.5
Arginina	8.5
Ácido aspártico	7.8
Ácido glutámico	13.2
Glicina	6.1
Prolina	3.3
Serina	4.1

Fuente: Koziol, M.J. 1992. Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (Chenopodium quinoa Willd). J. Food Comp. [7]

3.1.2. Variedades de quinoa

Existen diversos tipos de quinoa, la blanca, también conocida como la quinoa dorada es la más reconocida y la que más se comercializa. Además existen la quinoa roja, la naranja e incluso la morada. No existe mucha diferencia entre ellas en cuanto a las propiedades nutritivas pero cada una tiene su sabor y textura característica. [8] Las principales son:

- **Quinoa blanca:** La versión clásica tiene el sabor más delicado y gracias a su textura ligera queda más esponjosa una vez cocinada. Tal vez es la variedad más versátil, contiene menos calorías que las otras y posee más fibra que la quinoa roja, por lo que promueve la salud del sistema digestivo, controla los niveles de azúcar en la sangre y brinda sensación de saciedad. Es rica en proteínas, lo que ayuda a la quema de grasas y fortalece la musculatura y los tejidos. [9]
- **Quinoa roja:** En comparación con la blanca, la quinoa roja proporciona un poquito más de proteínas y también es más rica en riboflavina. Es la que contiene menos grasas y es la más alta en carbohidratos, lo que la hace un excelente alimento para deportistas. A diferencia de la quinoa blanca que sabe a nueces, la variedad roja tiene un sabor más terroso. La quinoa roja es muy utilizada en recetas vegetarianas. [9]
- **Quinoa negra:** Nació como un híbrido de la cruce de semilla de quinoa y de espinaca. Su sabor es terroso y aunque sea cocinada es la que más conserva el característico chasquido de grano al ser consumida. Es atesorada por ser rica en litio, un metal que puede prevenir la depresión, según estudios médicos. Además posee propiedades antiinflamatorias y cicatrizantes. [9]

3.1.3 Importancia económica

Debido a sus importantes características nutricionales, en los últimos años se aprecia una gran demanda de este producto por mercados internacionales, según el Ministerio de Agricultura del Perú (2007). Durante el año 2006, el Perú exportó 1277,1 toneladas de quinoa y para el año de 2007 esta cantidad se incrementó en un 23,4%, haciendo un total de 1575,7 toneladas de quinoa exportadas. Estas exportaciones que generaron 1548,1 millones de dólares para el año 2006 y 2035,0 millones para el 2007 respectivamente. Para el año 2010, Brasil se convirtió en uno de los principales compradores de quinoa del Perú, [10] Con mercados abriéndose para este cultivo, se convierte en una gran alternativa de producción para los productores principalmente de las zonas más pobres del Perú.

Se determina que la evolución del crecimiento de la producción de la quinoa desde el 2000 al 2015, a partir de los datos cuantitativos obtenidos de informes anuales del Ministerio de Agricultura, Ministerio de la Producción, Ministerio de Comercio Exterior, Censo Nacional Agropecuario 2012, donde se observa que la producción de quinoa al 2015 en los últimos 16 años se ha incrementado en más de 500%, este dato concuerda con los pronósticos de la FAO, y los reportes mensuales y anuales que emite la Superintendencia Nacional de Administración Tributaria del Perú (SUNAT). En Bolivia también se ha incrementado en la misma proporción de acuerdo con las cifras obtenidas en los informes del Viceministerio de Desarrollo Rural y Agropecuario e INE-Bolivia. [3]

Aunque el mayor productor mundial de quinoa es Bolivia, también se produce actualmente en Argentina, Chile, Perú y Colombia e incluso en Estados Unidos. En Venezuela, hay registros que indican que se cultivaba en los Andes merideños y su siembra no fue de relevante importancia [12]. También se han empezado a hacer

pruebas de siembra en los estados Aragua, Lara y Trujillo sin obtenerse aún grandes producciones del producto [13].

3.2. Pesticidas

Existen diferentes definiciones para los pesticidas, según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) se define a los pesticidas como cualquier sustancia o mezcla de sustancias de carácter orgánico destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan daño o que interfieran de cualquier forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos y/o productos agrícolas [14].

También se incluye en la definición como sustancias destinadas a regular el crecimiento de las plantas, desecantes, agentes para reducir la densidad de frutas o agentes para evitar la caída prematura de los frutos y las sustancias aplicadas a los cultivos antes y después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro por almacenamiento o transporte [14].

En un pesticida, el compuesto que actúa contra la plaga se llama ingrediente activo. Los pesticidas comerciales pueden contener uno o más de esos ingredientes, acompañados de un número variable de sustancias inactivas. Los ingredientes activos actúan de diversas maneras. Por ejemplo, muchos insecticidas afectan el sistema nervioso de los insectos plaga, lo que les impide obtener suficiente alimento o

reproducirse. A veces el individuo-plaga no muere de inmediato por efecto del producto, sino por inanición [5].

3.2.1. Residuos de Pesticidas

Definido por el Código Internacional, como cualquier sustancia específica presente en los alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales como consecuencia del uso de pesticidas [14].

El término incluye cualquier derivado de pesticidas, como productos de conversión metabólicos, productos de reacción e impurezas consideradas de importancia toxicológica. El término "residuo de pesticida" incluye tanto los residuos de procedencia desconocida o inevitable, como los derivados de usos conocidos de sustancias químicas [14].

3.2.2 Clasificación

Los pesticidas pueden clasificarse atendiendo diversos aspectos de acuerdo a su actividad contra plagas, al destino de aplicación, según su toxicidad y a la composición química de los mismos, siendo estas últimas las de mayor relevancia para el estudio y se describirán a continuación.

- **Según su toxicidad:** La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda, definida ésta como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto. La

toxicidad se mide a través de la dosis letal media (DL50) o de la concentración letal media (CL50). Ambos parámetros varían conforme a múltiples factores como la presentación del producto (sólido, gel, líquido, gas, polvo, etc.), la vía de entrada (oral, dérmica, respiratoria), la temperatura, la dieta, la edad, entre otras. [6]

Tabla 3. Clasificación de los pesticidas según su toxicidad.

Clasificación Toxicológica de los Pesticidas				
Clasificación OMS según los riesgos	Formulación Líquida DL50 Aguda (mg/Kg)		Formulación Sólida DL50 Aguda (mg/Kg)	
	oral	dermal	oral	dermal
Clase I a Extremadamente tóxicos	>20	>40	>5	>10
Clase I b Altamente tóxicos	20 a 200	40 a 400	5 a 50	10 a 100
Clase II Moderadamente tóxicos	200 a 2000	400 a 4000	50 a 500	10 a 1000
Clase III Levemente tóxicos	2000 a 3000	> a 4000	500 a 2000	> a 1000
Clase IV No ofrecen peligro	> a 3000		> a 2000	

Fuente Organización Mundial de la salud OMS. [5]

- **Según su composición química:** referidos a la estructura y propiedades químicas de los mismos, según a la familia química a la que pertenecen pueden clasificarse en:

- **Pesticidas organoclorados:** Son compuestos químicos orgánicos, es decir cuya estructura principal está formada por una cadena de átomos de carbono, y como grupos sustituyentes átomos de cloro. Son los primeros insecticidas de síntesis que se usaron. El primer organoclorado que se sintetizó fue el DDT en 1939. Su persistencia fue muy apreciada en la época, presenta como característica común su baja solubilidad en agua y alta solubilidad en solventes orgánicos; este pesticida se caracteriza por su alta resistencia [15].
- **Pesticidas organofosforados:** Son compuestos químicos orgánicos derivados del ácido fosfórico, su estructura química derivan de la sustitución por restos orgánicos de fósforo pentavalente, no son persistentes en el medio ambiente, destruyéndose por hidrólisis (acción del agua), no dejando residuos ostensibles ni de larga duración. Por eso, se le asignan plazos de seguridad más cortos que a los organoclorados (se entiende como plazo de seguridad el intervalo que debe transcurrir entre el tratamiento y la recogida de la cosecha para el consumo en el caso de agricultura). Son además más eficaces contra insectos, Su modo de acción es interferir la transmisión nerviosa del insecto, por inhibición de la enzima colinesterasa. Son por lo tanto neurotóxicos. [16]
- **Pesticidas carbamatos:** son insecticidas orgánicos que comprende los derivados carbámicos donde el grupo funcional es N-COO-; se dividen en tres grupos: N-metilcarbamatos, dimetilcarbamatos y fenilcarbamatos. Actúa similar a los pesticidas organofosforados, siendo por lo tanto neurotóxicos. [17]
- **Pesticidas piretroides:** La actividad insecticida de las piretrinas naturales extraídas de la flor del pelitre (*Chrysanthemum cinaerifolium*) es conocida desde hace tiempo, pero sólo a partir de los años 1930 se empezaron a comercializar y aún todavía se usan, siendo eficaces para el control de moscas y mosquitos

, pero usándose poco en agricultura y jardinería debido a su degradación por la luz y el calor. Se clasifican en dos grupos: piretoides que conservan el anillo (ciclo propano característico de las piretrinas naturales) y piretroides que han perdido el anillo ciclopropano. La forma de actuación de los piretroides es paralizante. Las piretrinas son muy poco tóxicas para los mamíferos y muy tóxicas para los insectos, por lo que tiene un coeficiente de selectividad muy alto. Son también muy tóxicas para los peces y la fauna acuícola. [14]

3.2.3 Propiedades y características de los pesticidas organoclorados y organofosforados:

Debido a que en el análisis en muestras de quinoa nos centraremos en la determinación de pesticidas organoclorados y organofosforados, se especificará las principales características y propiedades tóxicas de estos compuestos.

3.2.3.1) Pesticidas organoclorados:

Bajo el nombre de plaguicidas organoclorados se agrupa un número considerable de compuestos sintéticos, cuya estructura química en general corresponde a la de hidrocarburos clorados, aunque, además de cloro, algunos de ellos poseen oxígeno o azufre, o ambos en su estructura.

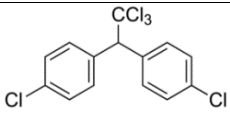
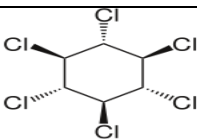
Son características comunes para estos compuestos, su baja solubilidad en agua y su elevada solubilidad en la mayoría de los disolventes orgánicos. Además, en general poseen baja presión de vapor y una alta estabilidad química, así como una notable resistencia al ataque de los microorganismos. En efecto, por su escasa solubilidad en

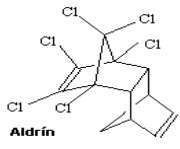
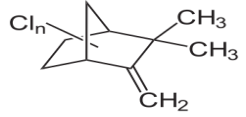
agua y elevada en disolventes orgánicos, se permite predecir que estos compuestos y sus productos de transformación tenderán a acumularse en el tejido graso de los organismos vivos, su baja presión de vapor y su gran estabilidad fisicoquímica condiciona la alta persistencia en el ambiente [15].

Fueron los primeros insecticidas químicos orgánicos utilizados de forma masiva a escala internacional demostrándose altamente eficaces y económicos. Sin embargo, su uso se ha visto muy restringido en los países desarrollados tras comprobarse su capacidad de bioacumulación y persistencia ambiental [18]. Su origen se remonta a la fabricación de DDT (2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano), arma importante en la lucha química en el control del mosquito transmisor de la Malaria (*Anopheles*). Sin embargo, al transcurrir los años se descubrieron problemas asociados al DDT, al punto de realizar su prohibición total en varios países por su alto nivel de toxicidad.

Atendiendo a su estructura, modo de síntesis u otra propiedad común, se propone la clasificación de estos compuestos [15]:

Tabla 4. Principales grupos de pesticidas organoclorados.

Derivado	Pesticida	Estructura
Aromático clorado	DDT, Dicofol, Metoxicloro, Clorobencilato	 <p>DDT</p>
Cicloalcano clorados	Hexaclorociclohexano (HCH)	

Ciclodiénicos clorados	Aldrin, Dieldrin, Endrín, Heptacloro, Endosulfan, Clordano, Mirex	
Terpenos clorados	Toxafeno	

Muchos estudios han demostrado la persistencia de los pesticidas organoclorados en suelos y en ambientes acuáticos. Estos ensayos muestran que el DDT puede permanecer en el ambiente hasta 30 años, el aldrín 6 años y el HCH más de 3 años. Cabe señalar que aunque los productos de degradación hayan perdido la acción insecticida pueden ser nocivos para la salud o para el equilibrio ambiental, además de que muchos de ellos son más estables que el producto original [18]. Estos datos pueden verse reflejados en la siguiente tabla:

Tabla 5. Persistencia de pesticidas organoclorados y su factor de bioacumulación.

Plaguicida	Duración de actividad (semanas)	Factor de Bioacumulación
Aldrín	520	4 444 (pez)
Dieldrín	>312	3 300 (pez)
Endrín	>624	1 000 (pez)
DDT	546	70 000 (ostión)
HCH	208	60 (ostión)
Lindano	>728	60 (ostión)

Fuente. Worting, S.B. "The Pesticide Scorecard" *Environmental Science and Technology*, vol 11, 756-776. (1977). [18]

La mayor parte de ellos son potentes inductores enzimáticos. Se eliminan por todas las vías y se encuentran metabolitos en bilis, heces, orina y leche. Los O-C actúan cambiando las propiedades electrofisiológicas y enzimáticas de las membranas de la célula nerviosa, sobre todo a nivel axonal¹¹. Producen un cambio en la cinética del flujo de iones Na^+ y K^+ a través de la membrana así como alteraciones del ion Ca^+ y de la actividad Ca-ATPasa y fosfoquinasa. Dan lugar a un enlentecimiento de la repolarización que produce la propagación de potenciales de acción múltiples para cada estímulo [15].

Se presenta a continuación los pesticidas organoclorados que se estudiaron en la muestra de quinoa y sus principales características:

- ***Aldrin y dieldrin:*** compuestos organoclorados que estructuralmente pueden ser similares, ambas son sustancias químicas sintetizadas suelen tratarse las dos sustancias en conjunto porque el aldrin se transforma en dieldrin cuando está en el ambiente o en el cuerpo humano, se usaron extensamente como insecticidas en cosechas de maíz y algodón en el control contra termitas [19]. Dentro de sus características y propiedades principales se tienen:

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas del aldrin y dieldrin**Aldrin:**

Nombre IUPAC	1,2,3,4,10,10-hexacloro- 1,2,4α,5,8,8α-hexahidro-1,4- endo,exo-5,8-dimetanonafalin
Abreviación del nombre (científico)	HHDN
Fórmula química	C ₁₂ H ₈ Cl ₆
Peso molecular	364,90 g/mol
Densidad	1,54 g/ml a 20 °C
Punto de fusión	49-60 °C
Presión de vapor	6,5 x10 ⁻⁵ mmHg a 20 °C
Solubilidad en agua	0,027 mg/L a 25 °C (prácticamente insoluble)

Dieldrin:

Nombre IUPAC	1,2,3,4,10,10-hexacloro-6,7-epoxi- 1,4,4α,5,6,7,8,8α-octahidro-1,4-endo,exo- 5,8-dimetanonafalina
Abreviación del nombre (científico)	HEOD
Fórmula química	C ₁₂ H ₈ OCl ₆
Peso molecular	380,90 g/mol
Densidad	1,62 g/ml a 20 °C
Punto de fusión	95 °C
Presión de vapor	3,1 x10 ⁻⁵ mmHg a 20 °C
Solubilidad en agua	0,186 mg/L a 25 °C

- **Heptacloro y Epoxyheptacloro:** pesticidas organoclorados insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos. Se volatilizan con facilidad y en consecuencia una fracción se desplaza a la atmósfera. Se liga con sedimentos orgánicos y se concentra en la grasa de los organismos. Heptacloro es metabolizado por los animales en epóxido de heptacloro, que tiene una toxicidad parecida y se acumula en la grasa [20], mientras que el Epóxido de heptacloro es un producto de degradación producido por bacterias del heptacloro al epóxido, es por ello que es más común encontrar este último en el ambiente, debido a sus altas persistencias se encuentran restringidos en varios países. [20]

Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas del heptacloro.

Nombre IUPAC	1,4,5,6,7,8,8-heptacloro-3a,4,7,7a-tetrahidro-4,7-metanoindano
Fórmula química	$C_{10}H_5Cl_7$
Peso molecular	373,3 g/mol
Densidad	1,58 g/ml a 20 °C
Punto de fusión	96 °C
Presión de vapor	0,053 Pa a 25 °C
Solubilidad en agua	0,056 mg/L a 25 °C

Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas del epoxyheptacloro.

Nombre IUPAC	1,6,8,9,10,11,11-heptacloro-4-oxatetraciclo-9-undecaeno
Fórmula química	C ₁₀ H ₅ Cl ₇ O
Peso molecular	389,30 g/mol
Densidad	1,58 g/ml a 20 °C
Punto de fusión	160 °C
Presión de vapor	0,097 Pa a 25 °C
Solubilidad en agua	0,043 mg/L a 25 °C

3.2.3.2) *Pesticidas organofosforados:*

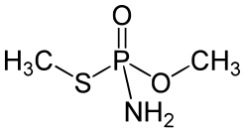
Los pesticidas organofosforados constituyen un amplísimo grupo de compuestos de síntesis, en general altamente tóxicos, con un precedente en los gases de guerra, a menudo conocidos bajo el apelativo de ‘gases nerviosos’, entre los que se encuentran el sarin, tabun y soman, y que se desarrollaron de manera especial a partir de la Segunda Guerra Mundial. Las propiedades de estos compuestos como insecticidas fueron el motivo de que ya en 1959 se hubieran sintetizado alrededor de 50.000, al revelarse como útiles elementos de lucha contra las plagas de insectos, por lo que forman parte, como ingredientes activos, de muchos formulados comerciales (en los que se integran distintos componentes, para obtener una mayor eficacia del ingrediente activo) [16].

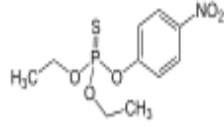
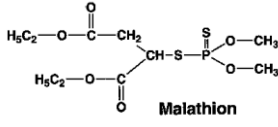
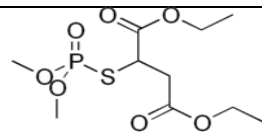
Son compuestos, en general, marcadamente apolares, lo que significa que desde el punto de vista químico la mayoría son escasamente solubles en agua, aunque con

grandes diferencias de un compuesto a otro, y desde el punto de vista biológico tienden a disolverse en grasas. Por tal motivo, la piel, donde se encuentra una importante capa de tejido con elevado contenido en lípidos, puede constituirse en una importante vía de entrada. La estabilidad de los organofosforados depende del pH del medio; a pH fuertemente alcalino se descomponen, lo que puede ser utilizado para destruirlos [17].

Los insecticidas organofosforados son muy tóxicos y liposolubles y su fórmula general deriva del ácido fosfórico, Pertenecen a diferentes familias: fosfatos, fosfonatos, fosforoamidotioatos, fosforodiamidatos, varias de ellas azufradas [16]. Son sustancias biodegradables en la naturaleza, sin tendencia a acumularse en las grasas del organismo pero con gran actividad neurotóxica al punto de producir intoxicaciones agudas de gravedad. 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 semanas; de hecho, este tipo de pesticidas junto a los carbamatos y piretroides son los insecticidas más ampliamente utilizados en la actualidad [17]. Se utilizan como insecticidas, acaricidas, antihelmínticos, nematocidas, quemoesterilizantes y rodenticidas; recientemente se han desarrollado como fungicidas, herbicidas y reguladores del crecimiento [21]. Estos pesticidas pueden clasificarse como:

Tabla 9. Principales grupos de pesticidas organofosforados.

Derivado	Pesticida	Estructura
Del ácido fosfórico	Alquilfosfatos Alquilpirofosfatos (metamidofos y acefato)	 metamidofos

Del ácido fosforotiónico	Paration	
Del ácido fosforotiolotionico	Malation	
Del ácido fosforotiólico	Malaoxón	

Dentro del grupo de los pesticidas organofosforados a analizar tenemos:

- **Diazinón:** es el nombre común de un pesticida organofosforado que se usa para controlar las plagas de insectos en la tierra, plantas ornamentales y cultivos de frutas y verduras. Antiguamente se utilizó como el ingrediente activo en productos para la casa y el jardín usados para controlar plagas de, por ejemplo, moscas, pulgas y cucarachas. El diazinón es una sustancia química sintética y no de origen natural en el medioambiente. [22]

Tabla 10. Propiedades fisicoquímicas del diazinón.

Nombre IUPAC	O,O-Dietil-O-(2-isopropil-6-metil-pirimidin-4-il)fosforotioato
Fórmula química	C ₁₇ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS
Peso molecular	304,3 g/mol
Densidad	1,116 g/ml a 20 °C
Punto de fusión	120 °C

Presión de vapor	9.01 x10 ⁻⁵ mmHg a 25 °C
Solubilidad en agua	40 mg/L a 25 °C

- **Etión:** es un insecticida y acaricida organofosforado utilizado desde la década de los 50, Es utilizado en la agricultura principalmente para controlar insectos en árboles de frutas cítricas (como limones, naranjas, etc.) aunque también se puede utilizar en cultivos de algodón, otros árboles frutales y nueces, así como en algunas hortalizas, puede ser usado en prados y céspedes. [23]

Tabla 11. Propiedades fisicoquímicas del etión.

Nombre IUPAC	Dietoxifosfinotiosulfanimetilsulfanil-dietoxi-sulfaniledina-5-fosfano
Fórmula química	C ₉ H ₂₂ O ₄ P ₂ S ₄
Peso molecular	348,48 g/mol
Densidad	1,22 g/ml a 20 °C
Punto de fusión	165 °C
Presión de vapor	1,5 x10 ⁻⁶ mmHg a 25 °C
Solubilidad en agua	10 mg/L a 25 °C

- **Malatión:** pesticida poco persistente pero de toxicidad aguda, combate piojos y pulgas en animales domésticos, así como también combatir mosquitos y moscas de la fruta que afectan sembradíos. El uso del Malatión se extendió por cuatro razones fundamentales: toxicidad relativamente baja para mamíferos, reducida

persistencia, amplio espectro y bajo precio. Puede considerársele "el DDT" de los organofosforados. Sin embargo, y al igual que el DDT, su uso fue más rápido que los estudios para determinar su real impacto. En los últimos veinte años se acumuló una abundante evidencia bibliográfica que describe los efectos negativos del Malatión sobre la salud humana y los ecosistemas [24].

Tabla 12. Propiedades fisicoquímicas del malatión.

Nombre IUPAC	2-[(dimetoxifosforotioil) sulfanil]butanodioato de dietilo
Fórmula química	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂
Peso molecular	330,35 g/mol
Densidad	1,23 g/ml a 20 °C
Punto de fusión	2,9 °C
Presión de vapor	0,016 Pa a 25 °C
Solubilidad en agua	145 mg/L a 25 °C

- **Fenitrotión:** es un insecticida que ya no está aprobado para su uso, tiene una baja solubilidad acuosa, es altamente soluble en muchos solventes orgánicos y es volátil. Fenitrotión tiene un bajo potencial de lixiviación a las aguas subterráneas y no se espera que sea persistente en el suelo o los sistemas de agua. Es moderadamente tóxico para los mamíferos, considerado un disruptor endocrino y un inhibidor de la colinesterasa. Es altamente tóxico para aves, invertebrados acuáticos y abejas, y moderadamente tóxico para peces, algas y lombrices. [25]

Tabla 13. Propiedades fisicoquímicas del fenitrotión

Nombre IUPAC	O, O-dimetil O-(3-metil-4-nitrofenil) fosforotioato
Fórmula química	C ₉ H ₁₂ NO ₆ PS
Peso molecular	277,23 g/mol
Densidad	1,3 g/ml a 20 °C
Punto de fusión	0,3 °C
Presión de vapor	0,018 Pa a 25 °C
Solubilidad en agua	insoluble

- **Metilparatión:** pesticida que se emplea para combatir hormigas, piojos, termitas y plagas similares, presenta una alta toxicidad y una baja persistencia, la exposición continua a dosis elevadas es fatal para el ser humano. Es posible que cause daños a ecosistemas en casos de gran exposición resultante al uso indebido o a derrames accidentales; El etilparatión fue excluido de la lista de sustancias activas autorizadas para el uso en productos de protección de plantas en 1991 bajo la Ley para protección de plantas contra plagas y pestes en muchos países. Prohibida la producción, uso y comercialización de todos los productos de protección de plantas que contengan etilparatión. [26]

Tabla 14. Propiedades fisicoquímicas del etilparatión.

Nombre IUPAC	O, O-dimetil-O-4-nitrofenilfosforotioato
Fórmula química	C ₁₀ H ₁₄ NO ₅ PS
Peso molecular	291,27 g/mol
Densidad	1,260 g/ml a 20 °C
Punto de fusión	10,18 °C
Presión de vapor	0,005 Pa a 25 °C
Solubilidad en agua	24 mg/L a 20 °C

3.2.4 Comparación de los pesticidas organoclorados y organofosforados:

Debido a que se analizaron estos dos tipos de pesticidas, es importante diferenciar las características principales de cada uno, saber de qué depende el uso de ellos, el tipo de plaga a atacar, reconocer sus principales propiedades toxicológicas, de persistencia, impacto ambiental y efectos bio-acumulativos:

Tabla 15. Tabla comparativa entre los pesticidas organoclorados y organofosforados.

Propiedad	Organoclorado	Organofosforados
Estabilidad	Elevada	Muy baja
Selectividad	Baja	Alta
Persistencia	Alta	Baja
Hidrofobicidad	Alta	Baja
Efecto bio-acumulativo	elevada	Baja
Toxicidad	Baja	Alta

Costo	Bajo	Alto
-------	------	------

3.2.5 Uso de pesticidas en cultivos de quinoa:

Al principio, todos los cultivos requieren el control de plantas invasoras de cultivo, enfermedades y plagas. La selección del método de control de plagas normalmente es hecha basándose en la información disponible sobre la estimativa de la pérdida, eficiencia del método, costo del control e impacto ambiental.

No existe una reglamentación específica con relación al tipo de agrotóxicos que pueden ser usados en determinados cultivos, siendo usados indistintamente para todos los cultivos, según sea el problema; existe una recomendación realizada por el Codex en la cual manifiesta que pueden ser usados algunos productos tales como: Baytroid TM 5c25, Bulldock 025 FC, Metasistox, Lorsban seco para el control de algunas plagas y enfermedades del cultivo de quinoa [27].

El estudio de los niveles de residuos de pesticidas y el control de sus límites en alimentos es de gran interés y preocupación a nivel mundial. En orden de proteger a los animales y la salud de los humanos la Organización de las Naciones unidas para la alimentación y agricultura (FAO) en conjunto con otras instituciones han establecidos límites máximos residuales (LMR) para pesticidas en matrices de alimentos considerando la estabilidad y toxicidad de estos compuestos. La tabla 16 muestra un resumen de algunos pesticidas reportados en algunos alimentos como cereales, granos y recientemente algunos publicados en matrices de quinoa.

Tabla 16. Límites máximos permitidos de pesticidas organofosforados y organoclorados en algunos cereales y granos establecidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura FAO.

Pesticida	Cereal Granos (mg/Kg)	Trigo (mg/Kg)	Harina Trigo (mg/Kg)	Maíz en grano (mg/Kg)	Frijol seco (mg/Kg)	Granos especias (mg/Kg)	Arroz (mg/Kg)	Quinoa (mg/Kg)
Diazinón				0,02		5		
Heptacloro	0,02							
Aldrin	0,02							
Malation		10	0,2	0,05	2	2		
Fenitrotión	6					7		
Etilparatión								
Epoxyheptacloro	0,02							
Dieldrin	0,02							
Etión						3		
Metilparation					0,05	5		
Lindano	0,01			0,01	0,01			
Deltametrina	2		0,3	0,02				
Triazofos							0,6	
Imadoclopride	0,05		0,03	0,02				
Azoxystrobin		0,2		0,02			5	3
Deltametrina	2		0,3					
Azinfos								
Paration	0,1							
Forato	0,05		0,03	0,05				
Diclorvos		7	0,7				1,5	0,5
Etofenprox				0,05			0,01	5
Glifosato	30			5		2		5
Propiconazol		0,09		0,05				3
Espinetoram								0,04
Spinosad	1			0,01				0,02
Floruro de Sulfurilo	0,05		0,1				0,1	2

*Los valores reportados de límites máximos residuales para quinoa están reportados bajo la Comisión Europea no por la FAO.

3.3) Análisis de agrotóxicos en alimentos:

Los agrotóxicos desempeñan un papel muy importante en el desenvolvimiento de la agricultura desde su descubrimiento y síntesis, aumentaron significativamente la producción agrícola pero los peligros ocasionados por su aplicación se ven reflejados en la preocupación con la seguridad alimentaria y la salud humana, siendo cada vez más el foco de atención mundial. Así, diversos países tienen establecidos sus propios límites de residuos en el comercio internacional y muchos métodos analíticos vienen siendo desarrollados para ser aplicados en la determinación de residuos de agrotóxicos en diferentes tipos de alimentos [28].

Las propiedades físico-químicas de los agrotóxicos pueden variar considerablemente, una vez que, pueden presentar carácter ácido, básico y neutro. Estos compuestos pueden contener en su estructura, halógenos, fósforo, azufre o nitrógeno, heteroátomos que poseen una gran relevancia en el método de detección de estos compuestos. Un gran número de agrotóxicos son muy volátiles, otros no, esta grande diversidad provoca serios problemas en el desarrollo de un método "universal" para el análisis de residuos de estos compuestos [29]. Existen muchos métodos para análisis multiresiduos de agrotóxicos en productos agrícolas, pero es fundamental que la técnica pueda extraer decenas o centenas de sustancias de matrices complejas, que gran cantidad de interferentes co-extraídos puedan ser eliminados en la etapa del clean-up, y que las técnicas analíticas de detección adoptadas sean indicadas para la determinación.

3.4) Extracción de pesticidas:

En los últimos años, la preocupación con la seguridad alimentaria ocasionó un rápido desarrollo de métodos analíticos necesarios para la determinación de residuos de agrotóxicos. La investigación sobre residuos en el área ambiental y en la salud pública esta direccionada para la identificación y cuantificación de centenas de sustancias con diferentes propiedades físico-químicas en diferentes tipos de matrices. Así, una de las principales tareas de la investigación analítica es proporcionar métodos confiables, de fácil aplicación y con bajo costo [30].

El desarrollo de un método para análisis de residuos de agrotóxicos en alimentos es dificultado por diversos factores, tales como tiempo, necesidad de grandes cantidades de solventes orgánicos, varias etapas de extracción, tornando al análisis extremadamente laborioso, Los métodos multiresiduos son comúnmente preferidos para determinación de residuos de agrotóxicos porque permiten la determinación de varios compuestos en una única corrida analítica. Diversas investigaciones relacionadas a la determinación de residuos en frutas y legumbres indican que nuevos métodos están siendo desarrollados para la extracción y cuantificación de agrotóxicos. Estos métodos envuelven: homogenización, extracción, clean-up de los analitos de la muestra con solventes adecuados, concentración y determinación analítica. El paso del *clean-up* es el más trabajoso y demorado y es crucial en el análisis de residuos en alimentos. Si no fuera realizado con precisión, los problemas relacionados con la presencia de interferentes en la matriz hacen difícil la identificación de los compuestos. El *clean-up* debe ser realizado evitando las pérdidas de analitos más volátiles, debe ser suficientemente global para eliminar compuestos co-extraídos de la matriz; evitar falsos positivos, y permitir la identificación, cuantificación e confirmación del analito [31].

3.5) Métodos de extracción:

Dentro de las técnicas de extracción normalmente utilizadas para análisis de residuos se destacan líquido-líquido (LL), sólido-líquido (SL), la extracción con fluido súper crítico (SFE), la extracción en fase sólida (SPE), dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD), micro extracción en fase sólida (SPME) y extracción en fase sólida dispersiva (DSPE) [30].

- **Extracción líquido-líquido (LL):** se basa en el reparto del analito entre dos líquidos inmiscibles; la eficiencia del proceso depende de varios factores como la afinidad del analito por el disolvente y las extracciones sucesivas que se realicen.
- **Extracción sólido-líquido (SL):** los analitos se transfieren desde la matriz al disolvente seleccionado, la eficiencia de la extracción depende de la solubilidad, la transferencia de masa y el efecto de la matriz.
- **Extracción con fluido supercrítico (SFE):** técnica utilizada para la obtención de aromas y especias, la técnica emplea CO₂, el cual es sometido a condiciones de presión y temperatura hasta obtener el fluido súper crítico. Presenta como ventaja la posibilidad de obtener extractos concentrados y puros al vaporizarse el fluido a presión atmosférica.
- **Extracción en fase sólida (SPE):** en esta extracción la muestra se pasa por un cartucho o una columna empacada con un adsorbente en el cual quedan retenidos los pesticidas, seguida de una elución con un disolvente orgánico para obtener un extracto bastante limpio para luego ser analizado. Los adsorbentes más utilizados para esta técnica son las alquilsilícicas C₈ y C₁₈, fases poliméricas, copolímeros de vinilo, tierras de diatomeas o columnas de intercambio iónico.

- **Micro extracción en fase sólida (SPME):** técnica que no utiliza disolventes para extraer los analitos y está basada en el reparto de los analitos entre la matriz y una fibra de sílice fundida cubierta con una fase de adsorbente, donde se retienen los analitos por su fuerte o mayor afinidad.
- **Extracción en fase sólida dispersiva (DSPE):** método que utiliza una etapa de limpieza anterior al análisis que reduce el background o efecto matriz con el fin de disminuir los mantenimientos al sistema cromatográfico. Mejor conocido como método QuEChERS.

3.6) Métodos de extracción en fase sólida dispersiva, método QuEChERS:

El método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) (rápido, fácil, barato, eficaz, robusto y seguro) es un sistema de extracción en fase sólida que implica dos etapas fundamentales, la primera de extracción y la segunda una fase de limpieza del extracto mediante una extracción de fase sólida por dispersión. La metodología QuEChERS permite una extracción simplificada de un gran número de residuos de pesticidas en un amplio rango de matrices con características muy diferentes. Este procedimiento, aunque fue desarrollado inicialmente por el departamento de agricultura de Estados Unidos (FDA) para la determinación de plaguicidas en vegetales, ha sido también aceptado por la AOAC3 (AOAC 2007.01) y en Europa adaptado mediante la Norma EN 15662. [32]

Este método de preparación surgió por la necesidad de generar métodos multiresiduos rápidos y económicos que proporcionen resultados de gran calidad y fiabilidad. El método QuEChERS ofrece diversas ventajas como poco uso de reactivos, poco material de laboratorio y espacio físico; ofrece altas recuperaciones y resultados precisos y exactos en términos de reproducibilidad y exactitud.

El proceso consta de dos etapas, la primera de extracción y homogeneización 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 la extracción dispersiva en fase sólida para transferir los analitos a un solvente adecuado [33].

En la primera etapa, se realiza una extracción con un disolvente orgánico, generalmente acetonitrilo, en presencia de diferentes sales. Las sales que pueden ser empleadas en esta etapa son el sulfato de magnesio, el cloruro sódico, el citrato tribásico de sodio dihidrato y citrato de sodio dibásico sesquihidrato. La función de cada una de estas sales en la etapa de extracción es diferente:

- **Sulfato de magnesio** ($MgSO_4$) mejora la recuperación del analito al facilitar la partición de los pesticidas en la fase orgánica (acetonitrilo) gracias a que retiene agua.
- **Cloruro sódico** ($NaCl$) ayuda a controlar la polaridad favoreciendo la separación de fases entre el contenido de agua y la orgánica.
- **Acetato de sodio** ayudan a la regulación del pH.
- **Sales de citrato** se emplean para ajustar del pH a valores de 5,5 donde se extraen la mayoría de los componentes ácidos y básicos de la muestra.

La segunda etapa de este procedimiento corresponde a una limpieza o “clean-up” del extracto mediante la extracción en fase sólida dispersiva. Este paso facilita la eliminación del agua residual y de los compuestos presentes en la matriz del alimento que podrían provocar interferencias en el análisis, como los lípidos, azúcares, ácidos orgánicos y pigmentos. Las sales y adsorbentes empleados en esta fase son:

- **Sulfato de magnesio** ($MgSO_4$): elimina el exceso de agua residual.
- **Amina primaria/secundaria** (PSA): elimina ácidos orgánicos, ácidos grasos, azúcares y pigmentos de antocianina.
- **Adsorbente C18**: elimina grasas, esteroides y otras interferencias no polares de la muestra.
- **Carbón negro grafitado** (GCB): elimina pigmentos de la muestra como clorofilas y carotenoides.

Después del proceso de limpieza, se lleva a cabo una centrifugación y el extracto es directamente analizado o sometido a evaporación y recomposición en el disolvente apropiado para su análisis. [32]

Aunque el método “QuEChERS” fue desarrollado inicialmente para el análisis de plaguicidas en alimentos vegetales, en la actualidad se emplean algunas modificaciones de este método, con el objetivo de adaptarse a las distintas matrices y a nuevos compuestos. En este sentido, hay métodos adaptados para el análisis de pesticidas en aceites y alimentos infantiles, fármacos veterinarios en tejidos vegetales, fármacos en sangre, acrilamida, entre otros [33].

3.7) Métodos de análisis de pesticidas:

La detección de los pesticidas requiere de métodos de análisis sensibles y precisos para los que se han desarrollado técnicas que se basan en separaciones y análisis cromatográficos.

3.7.1) Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS):

La cromatografía de gases es una técnica usada para la separación de compuestos que pueden ser de origen orgánico e inorgánico y que sean térmicamente estables y volátiles, cuyo objetivo principal es la separación y cuantificación de los compuestos presentes en una muestra de interés. Es ampliamente utilizada por su gran sensibilidad, polivalencia y rapidez a la puesta a punto de análisis y a las posibilidades de automatización que acrecientan su interés [34].

Este tipo de cromatografía emplea distintos tipos de detectores para el análisis de las muestras, actualmente entre los detectores más usados se encuentra el detector de Masas basado en la técnica de la espectrometría de masas (MS).

Este tipo de técnica es una de las más frecuentemente utilizadas en la ejecución de análisis cuantitativo. Su especificidad, selectividad y límite de detección característicos son suficientes para enfrentar a la mayoría de los problemas analíticos, el desenvolvimiento de la MS en los últimos años llevó esta técnica a ser aplicada en prácticamente todos los campos analíticos. La espectrometría de masas está basada en la producción de iones del analito, en el análisis con relación a la masa/carga (m/z) de los mismos y los valores de detección que estos arrojan con el fin de verificar la presencia de las especies [31].

La espectrometría de masas es la técnica que mejor proporciona las informaciones estructurales necesarias para la identificación de los componentes de una muestra y por tanto, el acoplamiento entre La cromatografía de gases y la espectrometría de masas da origen a una herramienta analítica versátil y de gran potencial en el análisis cualitativo y cuantitativo [31]. Actualmente, es muy aplicable en la determinación de residuos de pesticidas, pudiendo determinar e identificar selectivamente compuestos de interés a niveles de concentración muy bajos en matrices bastante complejas.

3.8) Microscopia electrónica de Barrido para el análisis del tamaño de las muestras:

La microscopía de barrido de electrones (MEB) es una técnica de análisis superficial, que consiste en enfocar sobre una muestra densa un fino haz de electrones acelerado con energías de excitación desde 0.1kV hasta 30kV.

Este haz de electrones se desplaza sobre la superficie de la muestra realizando un barrido que obedece a una trayectoria de líneas paralelas. La interacción del haz de electrones con la muestra produce diversas señales (electrones secundarios, electrones retro dispersados, emisión de rayos X, etc.), que son recogidas por distintos detectores; los cuales permiten la observación, caracterización y microanálisis superficial de materiales de origen tanto orgánicos como inorgánicos. [35]

Este análisis se realiza mediante un microscopio que funciona con un haz de electrones producido por una fuente que puede ser un cañón termoiónico (filamento de tungsteno o de hexaboruro de lantano) o un cañón de emisión de campo FEG, de las siglas en inglés Field Emission Gun. [35]

El haz de electrones se desplaza sobre la muestra realizando un barrido en las direcciones X e Y de tal modo que la posición en la que se encuentra el haz en cada momento coincide con la aparición de brillo, proporcionalmente a la señal emitida, en un determinado punto de la pantalla.

La señal de electrones secundarios se forma en una delgada capa superficial, del orden de 50 a 100 Å. Son electrones de baja energía, menos de 50 eV, que pueden ser desviados fácilmente de su trayectoria emergente inicial y permiten obtener información

de zonas que no están a la vista del detector. Esta particularidad otorga a esta señal la posibilidad de aportar información “en relieve”.

La emisión de electrones retro dispersados depende fuertemente del número atómico de la muestra. Esto implica que dos partes de la muestra que tengan distinta composición se revelan con distinta intensidad aunque no exista ninguna diferencia de topografía entre ellas. Los rayos X que se generan en una muestra sometida a bombardeo electrónico permiten identificar los elementos presentes [36]

El microscopio electrónico de barrido está equipado con diversos detectores, entre los que se tiene el Detector de Electrones Secundarios para obtener imágenes de alta resolución SEI (Secondary Electron Image), un Detector de Electrones Retro dispersados que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie BEI (Backscattered Electron Image), y un Detector de Energía Dispersiva EDS (Energy Dispersive Spectrometer) permite coleccionar los Rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis semicuantitativo y de distribución de elementos en superficies.

Se pueden realizar estudios de los aspectos morfológicos de los distintos materiales con los que se trabajan, además del procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas. Las principales utilidades del Microscopio Electrónico de Barrido es la alta resolución (~1 nm), la gran profundidad de campo que le da apariencia tridimensional a las imágenes y la sencilla preparación de las muestras. [37]

La principal ventaja de este tipo de microscopía es alcanzar una extraordinaria amplificación de la imagen de la muestra manteniendo un poder de resolución mil veces mayor a un microscopio óptico, estas magníficas propiedades se deben a que la fuente de iluminación es un poderoso haz de electrones. [35]

Las aplicaciones de la técnica son muy numerosas tanto en ciencia de materiales, como en ciencia biomédica. Dentro de la ciencia de materiales destacan las aplicaciones en metalurgia, petrología y mineralogía, materiales de construcción, materiales cerámicos tradicionales y avanzados, electrónica, fractografía y estudio de superficies y composición elemental de sólidos en general. La microscopía electrónica de barrido también se aplica en botánica, en el estudio de cultivos celulares, en dermatología, en odontología y biomateriales, en hematología, inmunología, y en el estudio de la morfología de preparaciones biomédicas en general. [36]

3.9) Parámetros analíticos para la estandarización del método

- **Selectividad:** indica el grado de ausencia de interferencias con otras especies que contiene la matriz de la muestra; es decir, evalúa el grado de interferencia de especies como otro ingrediente activo, impurezas y productos de degradación así como compuestos de propiedades similares que pueden estar presentes, garantiza que el pico sea exclusivo del compuesto de interés, debe estar asegurada para que la linealidad, exactitud y precisión no estén comprometidas. El parámetro de calidad que la define es el coeficiente de selectividad [34].
- **Linealidad:** es la habilidad de un método analítico para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática son los deseados. Es un requerimiento en la práctica del análisis químico cuando se realizan curvas de calibración ya sea por el uso de patrones externos o internos, esta se basa en el uso de la ecuación de la recta:

$$Y = AX + B \text{ (ec. \#1)}$$

Donde:

Y: respuesta medida (área del pico)

X: concentración

A : inclinación de la curva de calibración = término asociado a la sensibilidad

B : intersección con el eje y, cuando $x=0$.

La linealidad de un método puede ser observada por el gráfico de los resultados de los ensayos en función de la concentración del analito o entonces calculada a partir de la ecuación de la regresión lineal, determinada por el método de los mínimos cuadrados. El coeficiente de determinación (R^2) es frecuentemente usado para indicar el cuanto puede ser considerado adecuado la recta como modelo matemático [34].

- **Sensibilidad:** La sensibilidad es un parámetro que demuestra la variación de la respuesta en función de la concentración del analito. Puede ser expresada por la inclinación de la recta de regresión de la calibración, y es determinada simultáneamente a las pruebas de linealidad. La sensibilidad depende de la naturaleza del analito y de la técnica de detección utilizada. [34]

La definición cuantitativa de sensibilidad aceptada por la IUPAC es la de sensibilidad de calibrado, que depende de la pendiente de la curva de calibrado a la concentración a determinar. La mayoría de las curvas de calibrado que se utilizan son de tendencia lineal y se pueden representar por la ecuación N° 2 [34]:

$$S = mc + S_{[b]} \text{ (ec. \#2)}$$

Donde

S: señal medida

c: concentración del analito.

$S_{[b]}$: señal instrumental del blanco

m: pendiente de la recta

- **Límite de detección (LOD):** representa la menor concentración de la sustancia en examen que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. Este límite depende de la relación entre la magnitud de la señal analítica y el valor de las fluctuaciones estadísticas de la señal del blanco [34], puede determinarse:

$$LOD = Y_{[B]} + 3.S_{[b]} \quad (\text{ec. \#3})$$

Donde:

$Y_{[B]}$: señal de la concentración del analito que proporciona una señal igual a la del blanco.

$S_{[b]}$: desviación estándar del blanco.

- **Límite de cuantificación (LOQ):** se define como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada, considerado como el límite de concentración más bajo para mediciones cuantitativamente más precisas. [34], se determina:

$$LOQ = Y_{[B]} + 10.S_{[b]} \quad (\text{ec. \#3})$$

Donde:

$Y_{[B]}$: señal de la concentración del analito que proporciona una señal igual a la del blanco.

$S_{[b]}$: desviación estándar del blanco.

- **Precisión:** permite evaluar la dispersión de resultados entre ensayos independientes, repetidos de una misma muestra, semejantes o patrones, en condiciones definidas. Es normalmente determinada para circunstancias específicas de medición y las dos formas más comunes de expresarla son por medio de la repetitividad y la reproductibilidad, siendo usualmente expresadas por la desviación estándar absoluta (S), la desviación estándar relativa (RSD) y el coeficiente de variación (CV) [34].

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad (\text{ec. \#4})$$

$$RSD = \frac{S}{\bar{x}} \quad (\text{ec. \#5})$$

$$CV = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100 \% \quad (\text{ec. \#6})$$

- **Exactitud:** es la concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia aceptado como convencionalmente verdadero. Debe ser verificada a partir de, mínimo nueve determinaciones contemplando el intervalo lineal del procedimiento, es decir tres concentraciones, baja, media y alta, con tres repeticiones cada uno. La exactitud es expresada por la relación entre la concentración media determinada experimentalmente y la concentración teórica correspondiente [34].

$$Exactitud = \frac{C_{media\ experimental}}{C_{teórica}} \cdot 100\% \quad (\text{ec. \#7})$$

4) ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

En la actualidad existe un gran interés por los contaminantes ambientales en relación con la seguridad alimentaria, numerosos estudios dan evidencia de que existen contaminantes orgánicos e inorgánicos persistentes que pueden ser encontrados en cantidades que afecten la salud; es por ello que se ha realizado la determinación de estos compuestos empleado diferentes matrices y métodos de extracción con el fin de verificar y cuantificar la presencia de estos compuestos a partir de técnicas analíticas. Varios investigadores se han interesado en estos estudios entre los que se pueden mencionar:

Pierre y Betancourt (2007) evaluaron el manejo de plaguicidas y la acumulación de residuos organoclorados y organofosforados en cebolla cultivada en sistemas de producción que utilizaron control químico de plagas en la depresión de Quíbor, estado Lara, Venezuela. Se seleccionaron tres sistemas representativos y se realizó un seguimiento durante el ciclo de cultivo para conocer el manejo de los plaguicidas empleados. Posteriormente, se recolectaron muestras de la cebolla cosechada para consumo y se analizaron mediante cromatografía de gases para determinar la presencia de residuos de organoclorados y organofosforados. Los resultados indicaron que en todos los sistemas se registró una prevalencia del uso de fungicidas sobre otros tipos de plaguicidas, así como el uso de insecticidas organoclorados y organofosforados altamente tóxicos, y sobredosisificación y alto número de aplicaciones. En dos de los sistemas de producción evaluados se detectaron residuos del herbicida butaclor (pesticida clorado) en un rango de 0,86 a 1,80 mg/kg siendo estos valores inaceptables. Se encontraron residuos del insecticida clorpirifos (pesticida fosforado) con valores promedio de 0,01 a 0,02 mg/kg en los tres sistemas, aunque no superaron los límites máximos establecidos por la FAO y la EPA. En uno de los sistemas se detectaron 0,02 mg/kg de residuos del insecticida dimetoato, aunque también por debajo de los límites

máximos según FAO. En el estudio se concluye que existe una relación entre el uso inadecuado de plaguicidas y la acumulación de residuos en el cultivo de cebolla. [38]

Vilca Zirena (2010) evaluó y estableció la metodología para un método multiresiduos QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe) para la extracción de residuos de agrotóxicos organoclorados y organofosforados en 24 muestras procedentes del departamento de Puno en Perú y de una muestra orgánica proveniente de Brasil de quinoa, se empleó la técnica de cromatografía líquida acoplada a masas tándem (LC- MS/MS) para la cuantificación de los mismos utilizando una columna C₁₈ y gradiente de acetonitrilo y agua como fase móvil, con esto se obtuvo coeficientes de correlación de las curvas de calibración satisfactorios para los pesticidas analizados ($R^2 > 0,99$), los límites de detección entre (0,005 – 0,0420) µg/Kg y el límite de cuantificación entre (0,014 – 1,274) µg/Kg. Esto arrojó que todas las muestras contenían residuos de al menos 5 agrotóxicos que según la Legislación Peruana ni el Codex Alimentarius acepta dentro de la normativa con estos resultados, indicando que la extracción QuEChERS es adecuada y la cuantificación LC-MS/MS es altamente sensible para la determinación de estos pesticidas. [39]

Ahumada y Zamudio (2011) desarrollaron un método multiresiduo para la determinación de 24 plaguicidas de diferentes características fisicoquímicas en tomate. El proceso de extracción se basó en el método QuEChERS y la determinación de los compuestos se realizó mediante cromatografía líquida ultrarrápida acoplada a espectrometría de masas. Los resultados de la validación indicaron que el método presenta porcentajes de recuperación de entre el 71,3 y el 114%, coeficientes de variación inferiores al 20%, límites de detección entre 0,002 y 0,225 mg/kg, límites de cuantificación entre 0,009 y 0,750 mg/kg. En los estudios de linealidad, para todos los parámetros evaluados, se obtuvieron resultados adecuados en los rangos de trabajo.

Para probar la metodología desarrollada, se evaluaron muestras de frutos de tomate provenientes del departamento de Boyacá y se halló indoxacarb (pesticida clorado) en cantidades inferiores al límite máximo de residuos. Con esto se verificó que la cromatografía líquida es válida para el análisis de pesticidas. [40]

Vilca Zirena, Torres Hortense y col (2012) determinaron que el control del tamaño de la partícula en el proceso de preparación de la muestra de quinoa mejora la uniformidad y representatividad de la muestra, lo que permite resultados más precisos y exactos en el análisis. Se probó el efecto en dos tipos de molinos uno en un procesador de alimentos y otra en un molino a bolas utilizando métodos criogénicos para la mejor partición de la muestra a diferentes tiempos de molienda; el proceso de extracción de los siete plaguicidas analizados fue por QuEChERS y la cuantificación se realizó usando cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC-ECD). El método logró una buena separación cromatográfica de los siete compuestos en 12 minutos, el método QuEChERS se ajustó cambiando el tipo de disolvente utilizado para la extracción a una mezcla de acetato de etilo con ácido acético glacial al 1%. Según los resultados, la sensibilidad de QuEChERS fue influenciado por el tamaño de partícula, mostrando un aumento de los efectos de la matriz para cuatro de los siete compuestos estudiados y el tamaño de partícula de 10 μm y usando método criogénico la molienda mejoró los porcentajes de recuperación del método. [41]

Pérez R (2013) empleó la extracción asistida por microondas (MAE) y QuEChERS como métodos de extracción para la determinación de pesticidas en fresa procedentes de La Colonia Tovar del estado Aragua, Venezuela, empleando la cromatografía de gases con espectrometría de masas para la cuantificación de los mismos, la MAE arrojó que es necesaria la optimización del método para cada pesticida por individual, obteniéndose valores de recuperación mayores al 90 % para cada agrotóxicos analizado;

mediante la extracción QuEChERS se obtuvo porcentajes de recuperación entre 86-94% de los pesticidas analizados, estos resultados indicaron que ambos métodos de extracción son favorables ya que los métodos arrojan valores de precisión y exactitud aceptables y altos valores de recuperación para los pesticidas estudiados. [42]

Ortega y Zamalloa (2014) determinaron residuos de 12 plaguicidas organoclorados, monitoreados también en granos de quinoa en la región de Puno-Perú, el método QuEChERS fue utilizado para la extracción de los pesticidas y un sistema cromatográfico de gases acoplado a un detector de captura de electrones (GC-ECD) para la detección y cuantificación de los pesticidas; los rangos de recuperación para los pesticidas variaron entre 73,66 a 128,09 % con una desviación estándar $\leq 16\%$, el método mostró linealidad con el coeficiente de correlación $R^2 > 0,99$ y los límites de cuantificación variaron entre 0,001 a 0,010 mg/Kg. Estos resultados demostraron según estos investigadores la susceptibilidad de los granos de quinoa a acumular sustancias tóxicas y muestran la necesidad de establecer criterios para la certificación. [43]

5) OBJETIVOS

5.1) OBJETIVO GENERAL:

Optimizar un método de extracción multiresiduo para la determinación simultánea de pesticidas organoclorados y organofosforados en muestras de quinoa de diferentes procedencias usando la Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas (GC-MS).

5.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar la influencia del tamaño de partícula de muestras de quinoa sobre la extracción de pesticidas organoclorados y organofosforados.
- Aplicar el método QuEChERS para la extracción de pesticidas organoclorados y organofosforados en muestras de quinoa comercial de procedencia ecuatoriana y venezolana.
- Optimizar las condiciones experimentales para la cuantificación de pesticidas en las muestras de quinoa.
- Evaluar los parámetros analíticos para la determinación de pesticidas.
- Cuantificar pesticidas organoclorados y organofosforados en muestras de quinoa empleando la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas (GC-MS)".

6) METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

6.1) Instrumentación y accesorios

6.1.1) Instrumentación

- Para la molienda de las muestras de quinoa se utilizó un Molino de Bolas marca Spex 8000 D MIXER/MILL, voltaje 115V/60Hz, con un motor de 1/3 hp y 1750 RPM a 60 Hz, con temporizador y controles de botones de inicio y parada.
- Centrifuga modelo UNICO PowerSpin tm C8704, motor DC 300W, voltaje de 110/220 V, con un rango de velocidad de 500-4000 rpm, con control de velocidad variable digital y temporizador electrónico y sistema de cierre de la tapa de seguridad de cero RPM.
- pH-metro modelo HANNA-Instruments HI 2223 Calibration Check pH/ORP Meter.
- El análisis de Microscopía Electrónica de Barrido se llevó a cabo en un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), FEI Inspect F-50, equipado con EDX Apollo X EDAX.
- Cromatógrafo de Gases Thermo SCIENTIFIC TRACE GC ULTRA con detección de masas Thermo SCIENTIFIC ISQ.
- Columna capilar marca Thermo SCIENTIFIC, relleno 50% Phenyl polysilphenylene – Siloxane Mid Polarity, de longitud de 30 metros, diámetro interno de 0,25 mm y recubrimiento de 0,25 μm .

6.1.2) Accesorios:

- Para la extracción QuEChERS se emplearon cartuchos de extracción en fase sólida de amina primaria secundaria PSA marca Agilent Technologies, BOND ELUT-PSA (extracción), 500 mg, 6 mL, 50/PK.

6.2) Reactivos:

- Estándar de pesticidas órganofosforados de la marca CHIRON AS, PHOSPHOROUS PESTICIDES, 5 componentes en 2 mL de ciclohexano (diazinón, malatión, fenitrotión, etilparatión y etión) de 5 mg/L. Lote S-4403-5K-2CY.
- Estándar de pesticidas órganoclorados de la marca CHIRON AS, CHLORATED PESTICIDES, 6 componentes en 2 mL de ciclohexano (heptacloro, aldrin, epoxyheptacloro cis y trans, dieldrin) de 5 µg/mL. Lote S-4402-5-CY.
- Acetonitrilo (C₂H₃N) SIGMA-ALDRICH, CHROMASOL V ®, gradient grade para HPLC ≥99,9%.
- Sulfato de Magnesio (MgSO₄) anhidro grado analítico marca MALLINCKRODT®
- Cloruro de sodio (NaCl) grado analítico, REAGENTS S.A, Laboratorio Cicarelli ProAnálisis.
- Agua desionizada Milli-Q.

6.3) Muestras utilizadas:

Se usaron muestras comerciales de procedencia ecuatoriana y venezolana:

- **Quinoa cultivada en Ecuador:** *QUINOA VERDE PAMBA*, envasada por Sucesores de Jacobo Paredes M.S.A, Cusubamba, Quito – Ecuador, fecha de elaboración 30 de enero de 2017, lote de producción 04030.
- **Quinoa cultivada en Venezuela:** *TOP QUINOA* “El secreto para vivir mejor”; alimento Gluten Free, rico en proteínas, fibra y antioxidantes. Distribuido y producido por Agro Oro Branco, el Tejero, Sector Casupal, Estado Monagas – Venezuela. Lote de producción 852675.

6.4) Tratamiento de la muestra:

6.4.1) Pre-tratamiento de la muestra

Las muestras de quinoa cultivadas en Ecuador y Venezuela fueron sometidas a un proceso de molienda utilizando un molino a bolas modelo Spex 8000 D MIXER/MILL. Las muestras fueron sometidas a dos tiempos de molienda: 15 minutos y 30 minutos, el tamaño de las partículas a este tiempo de molienda fueron analizados usando Microscopía electrónica de barrido (SEM), FEI Inspect F-50, equipado con EDX Apollo X EDAX, con el fin de verificar la influencia del tamaño de partícula sobre la absorción de los pesticidas estudiados.

Los procesos de moliendas fueron llevados a cabo cada 5 minutos continuos y 2 minutos de reposo entre cada molienda,

Los parámetros considerados en las moliendas de las muestras a los diferentes tiempos se muestran en la tabla 17:

Tabla 17. Parámetros considerados en la molienda de las muestras de quinoa cultivada en Ecuador y Venezuela.

Parámetros	T= 15 min	T=30min
Masa de la muestra de quinoa	(25,00 ± 0,01) g	(25,00 ± 0,01) g
Relación masa carga	≈ 1	≈ 1
Tiempo de molienda continuo	5 min	5 min
Tiempo de descanso	2 min	2 min
Repeticiones	3 repeticiones	6 repeticiones
Total de la molienda	15 min	30 min
Total del trabajo	19 min	40 min

6.5) Preparación de patrones y curva de calibración:

A partir de una mezcla de estándares certificados marca Chiron AS de concentración 5 ppm de pesticidas organoclorados y organofosforados respectivamente, se preparó la curva de calibración en un rango comprendido desde 0,05 ppm hasta 0,50 ppm. Estos patrones se inyectaron en el Cromatografo de Gases y con los datos obtenidos se construyó la curva de calibración para cada pesticida analizado.

6.6) Tratamiento o fortificación de la muestra:

La muestra de procedencia ecuatoriana fue fortificada por duplicado en dos niveles de concentración desde 0,01 mg/Kg y 0,10 mg/kg, rango comprendido para todos los pesticidas de interés, luego a ambas muestras de quinoa se le aplicó la técnica de extracción en fase sólida QuEChERS con el objetivo de determinar la cantidad de los pesticidas presentes en las muestras analizadas.

6.7) Método de Extracción QuEChERS:

Para llevar a cabo este método de extracción se pesó 5 gramos de la muestra de quinoa ecuatoriana previamente molidas a 15 y a 30 minutos, se colocó en un tubo de polipropileno, se añadió la mezcla de pesticidas organoclorados y organofosforados para concentraciones finales de 0,01 ppm y 0,10 ppm respectivamente dejando impregnar por 5 minutos, se agitó en un vortex por 5 minutos y se dejó reposar por una hora.

Posteriormente se homogeneizó la muestra con 5 mL de agua Milli-Q, se le agregó 10 mL de acetonitrilo como agente extractivo, se agitó vigorosamente 1 minuto y se agregó cloruro de sodio y sulfato de magnesio para la limpieza del extracto. Se agitó la muestra y se centrifugó; se tomó una parte del sobrenadante y se purificó empleando un cartucho de absorbente de amina primaria secundaria PSA, este extracto final se utilizó para el análisis por cromatografía de gases masas. Este procedimiento se realizó para la muestra molida a 15 y 30 minutos. Ver esquema:

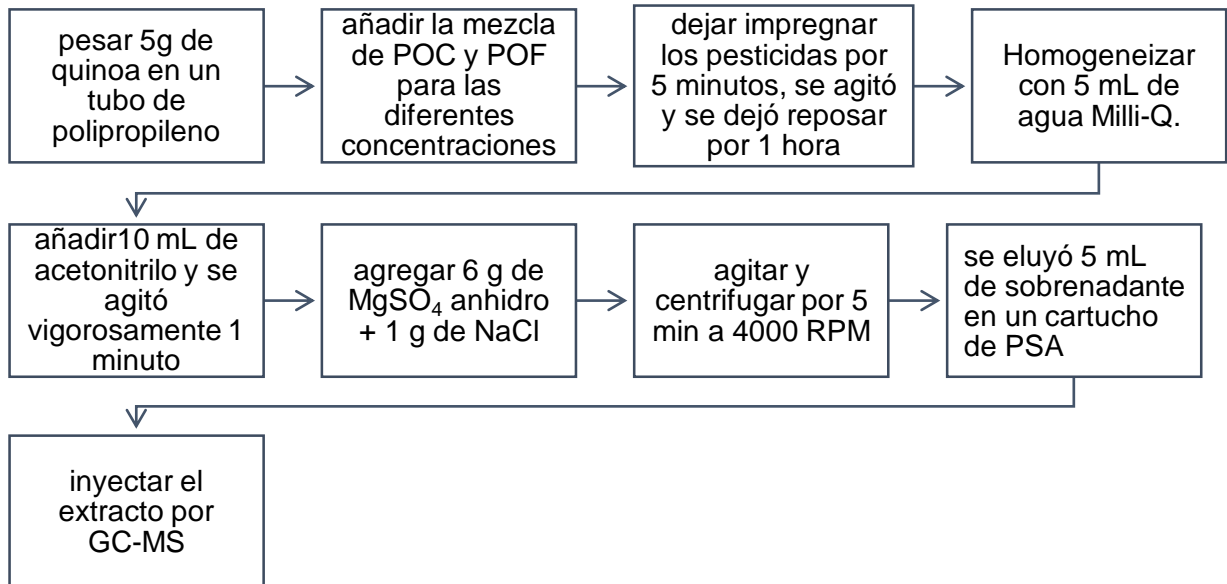


Figura 1. Esquema del proceso de extracción QuEChERS.

6.8) Estudio de recuperación de los pesticidas.

Se realizó el estudio de recuperación de los pesticidas organoclorados y organofosforados usando el método QuEChERS, se evaluó dos condiciones en el estudio de la recuperación considerándose el tamaño de partícula de las muestras de quinoa de diferente procedencia y la concentración de pesticida clorado y fosforado añadido,

Los datos fueron analizados usando el paquete estadístico StatGraphics Centurion XVII [44]. Las variables consideradas para el análisis estadístico fueron el tamaño de partícula para la molienda a los dos tiempos 15 min y 30 min y la concentración de pesticida 0,01 mg/kg y 0,10 mg/kg.

6.9) Análisis cromatográficos de las muestras.

- La separación cromatográfica fue llevada bajo las siguientes condiciones experimentales:

Temperatura del inyector: 250 °C.

Tiempo total de corrida: 30 minutos.

Volumen de inyección: 1 µL.

Temperatura del horno: 350 °C.

Flujo del gas de arrastre: 1 mL/min.

Gas de arrastre: Helio

El programa térmico utilizado para la separación de los diferentes pesticidas se muestra en la tabla #18.

Tabla 18. Programa térmico del horno cromatográfico para la separación de los pesticidas

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

En la figura #2 se muestra el programa térmico antes mencionado:

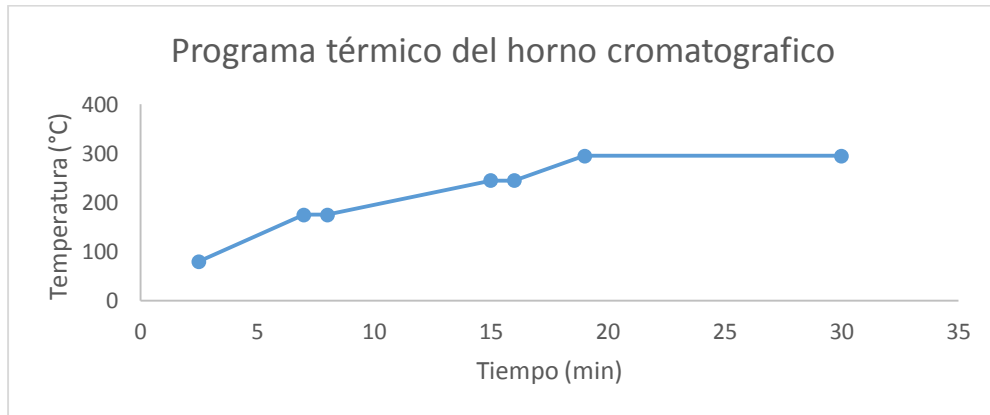


Figura 2. Programa térmico del horno cromatográfico para la separación de los pesticidas.

7) RESULTADOS Y DISCUSIONES:

Análisis micro estructural de las muestras.

Para el estudio de la presencia de pesticidas en muestras de quinoa ecuatoriana y venezolana, como primer paso se llevó a cabo la molienda del producto a analizar a diferentes tiempos, esto con el fin de evaluar la influencia de absorción y de extracción de los agrotóxicos en las muestras con diferentes diámetros de partícula.

Las muestras molidas a 15 minutos y a 30 minutos, fueron analizadas en un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), FEI Inspect F-50, equipado con EDX Apollo X EDAX con el fin de determinar el tamaño del producto generado.

Los resultados obtenidos de las muestras analizadas por SEM son mostrados en la figura 3. Las micrografías muestran la presencia de partículas con diferentes tamaños y morfologías, para la muestra molida a 15 minutos (Fig.1A) se observan partículas de forma casi circular con un tamaño promedio de 1,20 μm , mientras que para la muestra molida a 30 minutos (Fig. 1B) se observa partículas aglomeradas también de formas esféricas pero de menor tamaño aproximadamente de 0,88 μm , indicando el efecto del tiempo de molienda sobre el tamaño de partículas producidas luego del proceso de molienda, observando que disminuye el tamaño de las partículas al aumentar el tiempo de molienda, todos estos análisis se hicieron para una población de partículas aproximada de $n=15$.

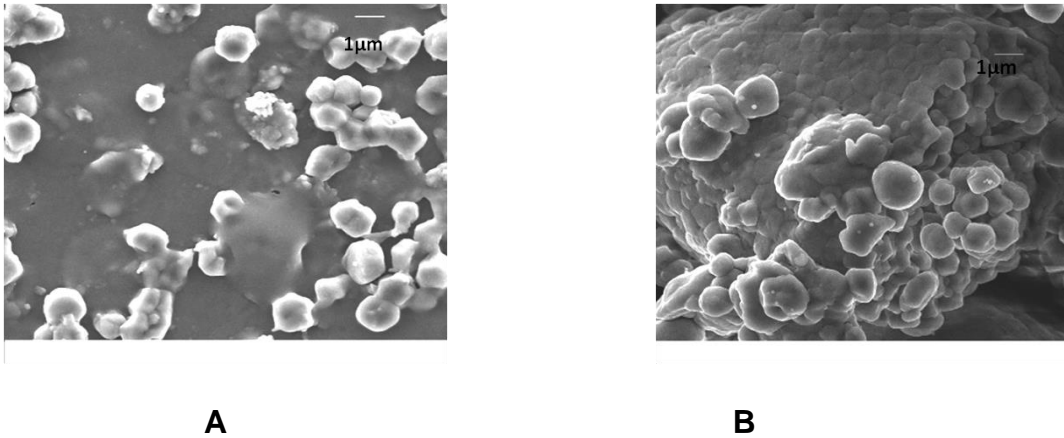
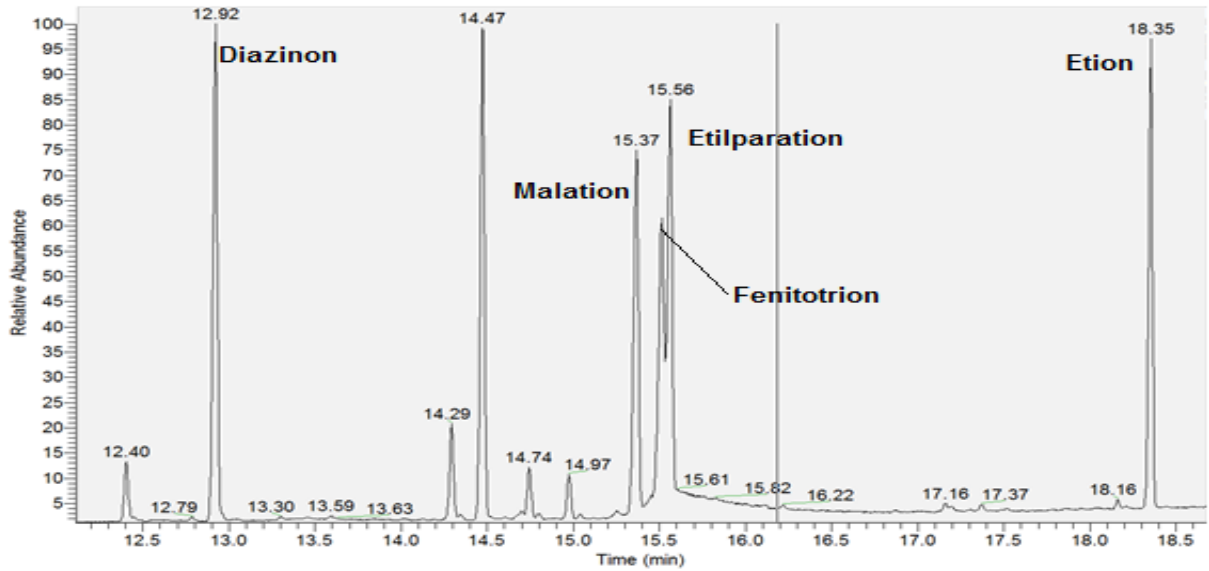


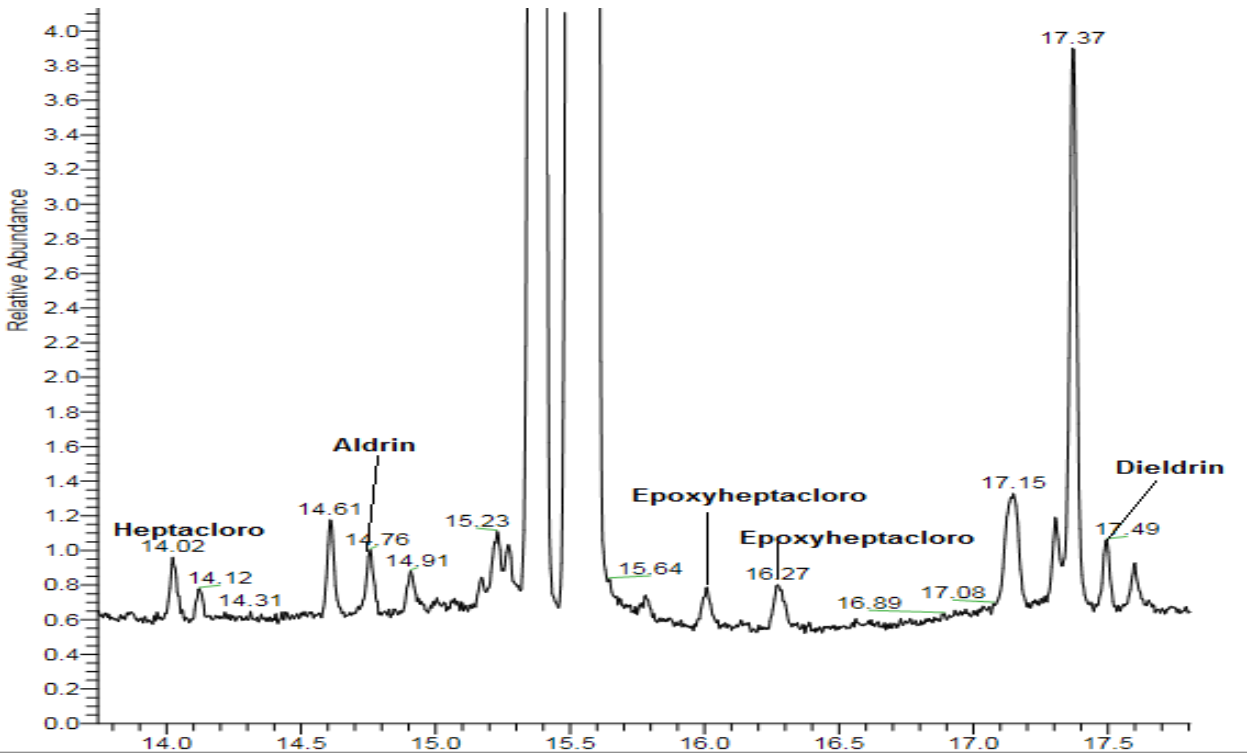
Figura 3. Microscopía Electrónica de Barrido para muestras de quinoa molidas a 15 minutos (A) y a 30 minutos (B).

Análisis por Cromatografía de Gases con detección Masas.

Las condiciones cromatográficas fueron optimizadas para todos los patrones de los pesticidas analizados, esto con el fin de obtener las mejores respuestas cromatográficas en función de la temperatura de la columna, del inyector y del flujo de la fase móvil. Las mejores condiciones encontradas se muestran en la tabla 18. En la figura 4 se presenta el orden de elución de los diez pesticidas evaluados bajo las condiciones optimizadas. La figura 4-A muestra el cromatograma de la mezcla de los 10 pesticidas evaluados, la figura 4-B es una ampliación del cromatograma para visualizar la presencia de los pesticidas organoclorados, dado que muestran intensidad de los picos menores a los compuestos organofosforados.



A



B (ampliación del espectro A)

Figura 4. Orden de elución y tiempos de retención para la mezcla de pesticidas organofosforados (A), ampliación para organoclorados (B) fortificados para el estudio en las muestras de quinoa.

En la figura 4, se observa que todos los pesticidas estudiados se resuelven bajo las condiciones de separación cromatográficas establecidas, en la tabla 19 se muestra el tiempo de retención a los cuales los mismos eluyeron.

Tabla 19. Tiempo de retención para los pesticidas estudiados.

Pesticida	Tipo de Pesticida	Tiempo de retención (min)
Diazinón	Organofosforado	12,92
Heptacloro	Organoclorado	14,09
Aldrin	Organoclorado	14,74
Malation	Organofosforado	15,37
Fenitrotión	Organofosforado	15,51
Etilparatión	Organofosforado	15,56
Epoxyheptacloro CIS	Organoclorado	16,01
Epoxyheptacloro TRANS	Organoclorado	16,22
Dieldrin	Organoclorado	17,37
Etión	Organofosforado	18,35

Puede notarse que en la mezcla de pesticidas no hay superposición de picos cromatográficos, sin embargo para los pesticidas organofosforados fenitrotión y etilparatión los tiempos de retención son muy cercanos entre si y hay poca resolución en

los picos que corresponden a estos compuestos, ambos compuestos pudieron ser caracterizados y cuantificados de manera inequívoca considerando sus espectros de masas usando la búsqueda del ion molecular y su pico base, además de comparar el espectro obtenido con el de la librería NIST (*Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología*) y del Sistema de datos Xcalibur del equipo cromatográfico. De igual manera se corroboró la identidad de cada pesticida en estudio.

Evaluación de los parámetros analíticos.

A fin de verificar el procedimiento analítico a usar se evaluaron los parámetros analíticos límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad y linealidad.

A partir de la construcción de la curva de calibración obtenida de patrones con concentraciones de 0,05; 0,10; 0,20 y 0,50 mg/L, se llevó a cabo los cálculos antes mencionados, los resultados obtenidos son presentados en la tabla 20 y 21:

Tabla 20. Límites de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).

Compuesto	LD ($LD = Y_0 + 3S$) (mg/Kg)	LC ($LC = Y_0 + 10S$) (mg/Kg)	valor de la pendiente $y = ax + b$
Diazinón	0,00013	0,00018	7E+09
Heptacloro	0,00667	0,00861	2E+07
Aldrin	0,00708	0,01767	9E+06
Malation	0,00036	0,00082	8E+09
Fenitrotión	0,01075	0,01668	3E+08

Etilparatión	0,00747	0,01354	2E+08
Epoxyheptacloro	0,01456	0,02859	9E+06
Epoxyheptacloro	0,00439	0,00889	7E+06
Dieldrin	0,01819	0,04416	2E+07
Etión	0,00034	0,00079	6E+09

Todos los compuestos analizados presentan en sus curvas coeficientes de correlación (R^2) mayores a 0,9900 a excepción de epoxyheptacloro cis, exhibiendo que existe una buena distribución lineal (tabla 21), lo que garantiza que la respuesta cromatográfica sea estable, lo que puede proporcionar respuestas en cuanto a la cuantificación de los pesticidas mucho más precisas. Las curvas obtenidas pueden ser consultadas en el anexo 1.

Tabla 21. Coeficientes de correlación R^2 de los pesticidas estudiados.

Compuesto	TR (min)	Ec. Recta	R^2
Diazinón	12,91	$y = 7E+09x + 8E+08$	$R^2 = 0,9948$
Heptacloro	14,03	$y = 2E+07x - 856421$	$R^2 = 0,9976$
Aldrin	14,74	$y = 9E+06x + 359149$	$R^2 = 0,9991$
Malation	15,36	$y = 8E+09x + 4E+08$	$R^2 = 0,9984$
Fenitrotión	15,51	$y = 3E+08x + 7E+06$	$R^2 = 0,9990$
Etilparatión	15,56	$y = 2E+08x + 4E+06$	$R^2 = 0,9993$
Epoxyheptacloro	16,01	$y = 9E+06x + 411600$	$R^2 = 0,9667$
Epoxyheptacloro	16,27	$y = 7E+06x + 1E+06$	$R^2 = 0,9961$
Dieldrin	17,5	$y = 2E+07x + 594159$	$R^2 = 0,9954$
Etión	18,37	$y = 6E+09x + 5E+08$	$R^2 = 0,9910$

Los valores encontrados de LD y LC se encuentran por debajo de los reportados para varios alimentos como se observa en la tabla 16 que indica los valores de LMR detectables, esto muestra la capacidad del equipo para detectar los analitos de interés y para la cuantificación de los mismos de manera fiable, libre de errores de las desviaciones estándar originadas por la señales del blanco relacionado a cada pesticida; además de contar con la librería en el equipo cromatográfico que ayuda a la identificación de cada compuesto, es por ello la gran aplicabilidad de la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas que arroja mejor información con alto nivel de sensibilidad en cada análisis.

Los límites de detección (LD) variaron desde los 0,00013 mg/Kg hasta los 0,01819 mg/Kg, los límites de cuantificación (LC) desde 0,00018 mg/Kg hasta 0,04416 mg/Kg. En estos resultados se pueden evidenciar que los valores obtenidos de LD y LC para los organofosforados son más bajos que los pesticidas organoclorados estudiados, esto también nos indica la diferencia en sensibilidad que existe entre los compuestos analizados.

Esta sensibilidad se puede evaluar mediante los valores obtenidos por las pendientes de la curva de calibración de cada pesticida que se presenta en la tabla 20, aquí se muestra la mayor sensibilidad de los pesticidas organofosforados corroborando esto también con la señal de los mismos en el cromatograma de la figura 4 donde se observan picos bastantes resueltos e intensos, mientras que para los organoclorados no se observa el mismo comportamiento, cuya sensibilidad es menor, se determinó que el menos sensible de los pesticidas analizados corresponde al Epoxyheptacloro, ya que hasta en el cromatograma los picos correspondientes para este compuesto es baja su intensidad.

Para los compuestos organoclorados Vilca y col en su investigación en el 2012 [41] donde utilizaron la técnica de GC-ECD encontraron valores LD en muestras de quinoa del Perú para el heptacloro de 0,049 mg/Kg mientras que para nuestra investigación el LD del mismo pesticida es de 0,0086 mg/Kg, se presenta el mismo comportamiento para otro pesticida clorado como el dieldrin donde Vilca y col obtuvieron un LD de 0,023 mg/Kg y en esta investigación se tuvo un LD de 0,018 mg/Kg indicando una vez más que los LD de los compuestos organoclorados analizados en esta investigación por GC/MS son mucho más bajos. En cuanto a los pesticidas fosforados Vilca y col en 2018 [51] desarrollaron estudios de los mismos usando la técnica de LC-MS y obtuvieron valores para el malatión de 0,004 mg/Kg mientras que en este estudio se obtuvo un LD de 0,00036. Es importante señalar que bajo la técnica de análisis GC-MS se obtuvo valores de LD mucho más bajos para cada grupo de pesticida estudiado, corroborando la gran sensibilidad del método para su análisis y aún su versatilidad ya que se estudian por simultáneo.

Es posible que esta variación a la sensibilidad esté sujeta a que en el primer caso a pesar de usar para ambos análisis la cromatografía de Gases el método de detección varía, en este trabajo se hace uso de un espectrómetro de masas que permite obtener mejores informaciones con mayor sensibilidad y en el caso de la cromatografía líquida comparten el mismo detector pero las técnicas cromatográficas son diferentes.

Evaluación del método QuEChERS

La muestra de quinoa a analizar podría contener componentes que pudieran interferir en la identificación y cuantificación de los pesticidas, por lo que se procedió a realizar la extracción usando el método QuEChERS con una muestra de quinoa ecuatoriana sin agregado de pesticidas y otra adicionando una concentración conocida de los pesticidas organoclorados y organofosforados de interés luego de realizado la

extracción QuEChERS, con el fin de verificar la presencia de los mismos. Estos resultados son mostrados en la figura 5 y 6.

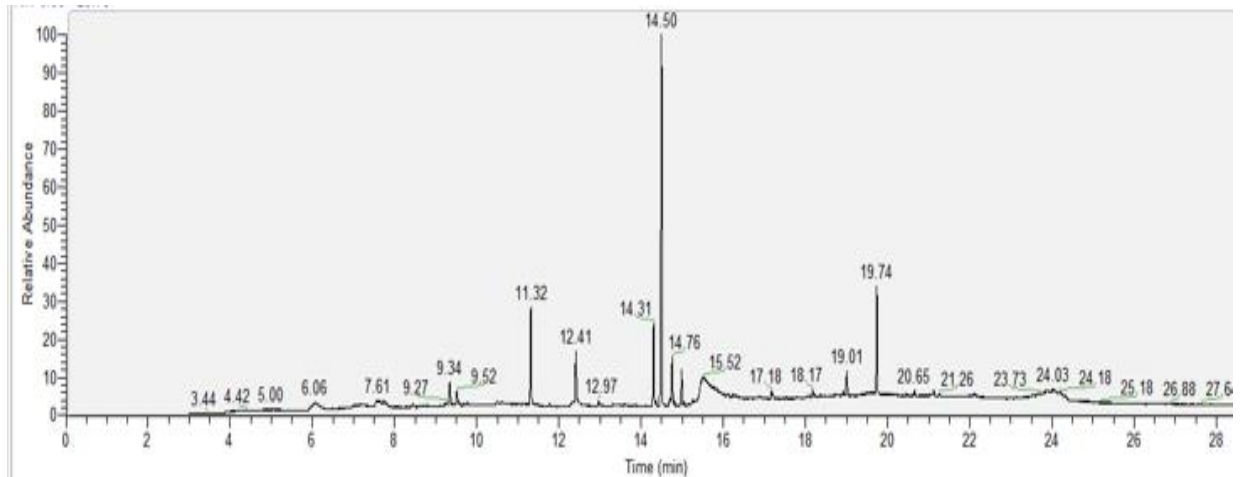


Figura 5. Muestra de quinoa ecuatoriana sin agregado de pesticidas.

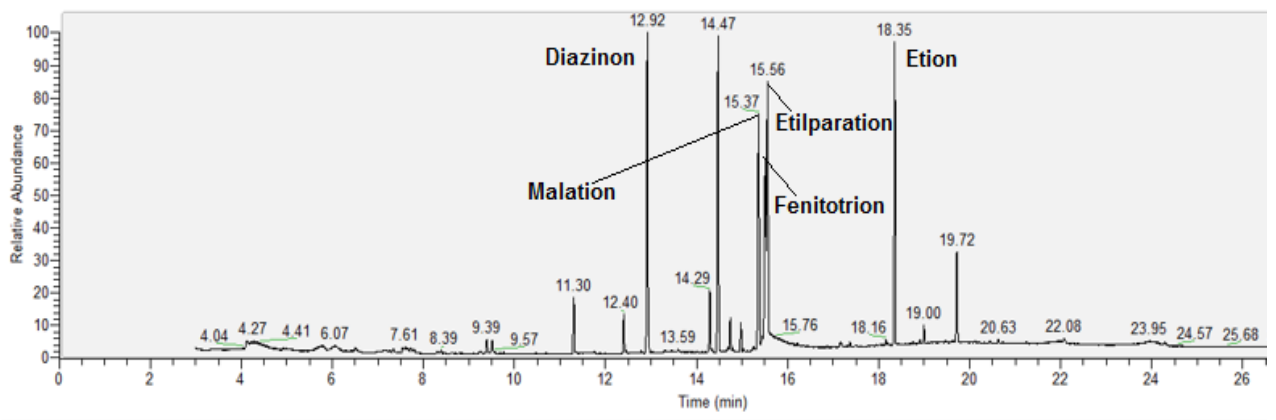


Figura 6. Muestra de quinoa ecuatoriana extraída con QuEChERS y enriquecida con una mezcla de pesticidas de 0,30 ppm POC y 0,10 ppm POP.

En las figuras 5 y 6 se puede observar que no existe interferencia entre los pesticidas analizados y los componentes orgánicos naturales de la quinoa, se evidencia la presencia de cada pico de pesticida sin superponerse con algún otro pico presente que pudiera corresponder a algún ácido graso de la matriz de la quinoa, ácido graso corroborado por la librería Nist del equipo cromatográfico, si se observó un pico ancho en la muestra sin pesticidas a los 15,52 minutos, el cual se determinó que corresponde a un ácido graso lográndose diferenciar del pesticida fenitrotión quien eluye en estas condiciones cromatográficas en el tiempo de 15,53 minutos pero sobre este pico ancho y que puede ser integrado, cabe destacar que aunque en la figura 6 solo se ve identificada la presencia de los pesticidas organofosforados se verificó de igual forma la presencia de los compuestos organoclorados ampliando la escala y los mismos tampoco interfieren con ningún componente del pseudo cereal.

Con esto se evidenció que los componentes naturales de la quinoa no interfieren en la identificación de los pesticidas. Además es importante resaltar que con la implementación del método QuEChERS se puede disminuir la presencia de los componentes interferentes de la quinoa como: ácidos grasos, saponinas y fuentes proteicas.

ESTUDIO DE RECUPERACIÓN DE LOS PESTICIDAS EN MUESTRA DE QUINOA ECUATORIANA

El estudio de recuperación fue llevado a cabo sobre la muestra ecuatoriana. Los resultados obtenidos para todos los pesticidas analizados bajo las condiciones estudiadas considerando la variable tamaño de partícula (0,88 μm y 1,20 μm) y concentración de pesticida añadido (0,01 mg/kg y 0,10 mg/kg) se muestra en la tabla 22:

Tabla 22. Porcentajes de recuperación para los pesticidas organoclorados y organofosforados para las condiciones experimentales.

Pesticida	% de Recuperación							
	t=15 min 0,01 mg/Kg	RSD	t=15 min 0,10 mg/Kg	RSD	t=30 min 0,01 mg/Kg	RSD	t=30 min 0,10 mg/Kg	RSD
Heptacloro	0,00	0,00	71,85	1,51	0,00	0,00	77,76	0,07
Aldrin	33,14	1,33	68,59	1,45	37,13	1,58	72,00	0,23
Epoxyheptacloro	39,86	5,78	79,92	1,62	0,00	0,00	81,98	0,36
Epoxyheptacloro	72,32	3,63	77,44	1,51	76,20	0,68	81,34	1,31
Dieldrin	79,77	3,25	84,94	0,95	84,86	0,77	91,10	0,52
Diazinon	43,50	2,76	89,04	0,55	44,74	0,48	90,29	1,50
Malation	60,49	3,54	75,94	4,01	63,68	1,36	79,01	2,65
Fenitrotion	61,89	3,78	79,36	1,04	64,82	0,83	82,19	1,57
Etilparation	71,10	3,40	92,40	0,73	70,30	0,92	94,75	1,09
Etion	66,38	4,04	86,94	0,34	73,84	0,81	90,32	1,58
Promedio	52,85	22,80	80,64	21,63	51,56	19,08	84,13	20,10

Como puede observarse en la tabla 22 los porcentajes de recuperación obtenidos para un tamaño de partícula de 1,20 μm ($t=15$ min) y con una concentración de enriquecimiento de 0,01 mg/Kg para el pesticida heptacloro no se obtuvo recuperación, ahora para los pesticidas aldrin, epoxyheptacloro cis, diazinón, malatión, fenitrotión y etión los porcentajes fueron menores a 70%, estos valores no son aceptables bajo la Comisión Europea (2007) ya que ellos establecen que los métodos analíticos multi residuales son considerados aceptables cuando los porcentajes de recuperaciones tienen valores entre un 70-120% con una sumatoria de los coeficientes de variación no mayor del 20%; mientras que se obtuvieron recuperaciones aceptables para los pesticidas epoxyheptacloro trans, dieldrin y etilparatión ya que cumplen con esta normativa por ser mayores al 70%. Cuando se trabajó con un mismo tamaño de partícula de 1,20 μm pero con una concentración de enriquecimiento de 0,10 mg/Kg se observó un aumento en el porcentaje de recuperación de los pesticidas y se consideró que casi todos a excepción de Aldrin entran en el rango de validez, bajo los estándares de la Comisión Europea.

Cuando se trabajó con un tamaño de partícula de 0,88 μm proveniente de una molienda de 30 minutos para una concentración de 0,01 mg/Kg no hubo recuperación alguna para los pesticidas heptacloro y epoxyheptacloro cis, nuevamente los pesticidas aldrin, diazinón, malatión y fenitrotión presentaron porcentajes menores a 70%, mientras que epoxyheptacloro trans, dieldrin, etilparatión y etión presentaron recuperaciones mayores al 70% con este tamaño de partícula. Con una concentración de enriquecimiento 0,10 mg/Kg todos los pesticidas presentaron porcentajes de recuperación mayores a 70%, esto indicó que es la mejor condición analítica experimental para la recuperación de todos los pesticidas analizados en las muestras de quinoa estudiadas, donde el porcentaje de recuperación promedio bajo esta condición fue de 84,13% con una sumatoria del coeficiente de variación de 20%, resultados totalmente aceptable analíticamente.

Al observar todos los porcentajes de recuperación bajo las condiciones experimentales realizadas se puede señalar que la mejor condición para el análisis de recuperación multiresidual de los pesticidas se produce en partículas con un tamaño más pequeño de 0,88 μm en un nivel de concentración alto de trabajo de 0,10 mg/Kg.

Para evaluar si el efecto de concentración es estadísticamente significativo en función de cada pesticida evaluado se realizó un análisis de varianza ANOVA de un factor. En general el método ANOVA contrasta si la diferencia entre las medias muestrales de los experimentos es demasiado grande para ser explicado mediante errores aleatorios; para ello se estima un F experimental a través del cuadrado medio de la variación entre muestra sobre el cuadrado medio de la variación dentro de muestra y se compara con F crítico con un valor de probabilidad P establecido, que usualmente es de 0,05. Es así que si los estimados de P son menores a este valor indica que existe un efecto sobre la respuesta no atribuida a errores aleatorios. [52]

La tabla 23 y 24 muestra estimados de F y T para los pesticidas organoclorados y organofosforados evaluados, agrupando el efecto de concentración de enriquecimiento con los diámetros de partícula de muestra de 1,20 y 0,88 μm respectivamente.

Tabla 23. Análisis de varianza de un factor para los pesticidas organoclorados y organofosforados con un tamaño de partícula de 1,20 μm (t=15 minutos)

Pesticida	valor F Exp	F crítico (95% de Confianza)	Valor de P
Heptacloro	1435,34	161,4	0,0000
Aldrin	1314,85		0,0008
Epoxyheptacloro CIS	112,91		0,0087
Epoxyheptacloro TRANS	1,70		0,3220
Dieldrin	11,55		0,7068
Diazinón	487,70		0,0020
Malation	16,02		0,0111
Fenitrotión	30,71		0,0311
Etilparatión	88,79		0,5071
Etión	73,83		0,0133

El análisis de ANOVA de un factor arroja valores de P que pueden demostrar la significancia de la variable concentración en el estudio de recuperación. En la tabla 23 se observa que para aquellos pesticidas donde los valores de P son mucho menores a 0,05 presentan un efecto de la concentración para su recuperación, esto también se puede corroborar al observar los valores de F experimental donde se considera la razón de las varianzas muestrales para determinar si existe diferencia entre las mismas, esto

se comparó con un valor de F crítico de una cola con un nivel de confianza de 95 %, los valores que están por encima de los F críticos indican que hay diferencia en la varianza y por lo tanto la variación de la concentración tiene un efecto importante sobre la extracción del pesticida.

Ahora, para los pesticidas epoxyheptacloro trans, dieldrin y etilparatión se tienen valores de P mayores a 0,05 por lo que la variable concentración no produce efecto importante en la recuperación y los cambios presentes en los porcentajes de recuperación son atribuidos a errores aleatorios.

Los pesticidas Heptacloro, Aldrin, Diazinón muestran un evidente efecto por el cambio de la concentración dado que sus valores de P son mucho menor a 0,05 y sus F experimental son mayores al F crítico. Mientras que los pesticidas Epoxyheptacloro cis, Malation, Fenitrotión y Etión tienen valores de P menores a 0,05, que muestran efecto de la concentración pero sus valores de F experimental son menores al F crítico, por lo que se observa igual el efecto aun cuando estos resultados numéricos de F no indican esto.

Si se retoma la tabla 22 se evidencia que aquellos pesticidas donde muestra el ANOVA un efecto de concentración importante como por ejemplo Heptacloro, Aldrin y Diazinón se observa un aumento significativo del valor de la recuperación cuando se trabaja a concentraciones altas en este caso de 0,10 mg/Kg, de hecho logran sobre pasar el 70% de recuperación con diámetro de partícula de 1,2 μm .

En el caso de los pesticidas Epoxyheptacloro trans, Dieldrin y Etilparatión, cuyo ANOVA no mostro efecto de concentración, en la tabla 22 muestran que los % de

recuperación son mayores de 70% tanto a los niveles de concentración de 0,01 como a 0,10 mg/Kg, por lo que se pueden analizar estos pesticidas en ambos niveles de concentración para un diámetro de partícula de 1,2 μm .

Para los pesticidas Epoxyheptacloro cis, Malation, Fenitrotión y Etión, que mostraron diferencia en el análisis de ANOVA, se observa en la tabla 22 que los % de recuperación mejoran y sobrepasan el 70 % cuando se trabajan en el nivel de concentración de 0,10 mg/kg, por lo que se puede afirmar que si es importante el efecto de concentración para estos pesticidas y que fue mostrado en el ANOVA solo con los valores de P menores a 0,05.

En la tabla 24 se muestra el análisis de ANOVA de un factor, con los diferentes pesticidas evaluados, para el efecto de concentración en un tamaño de partícula de 0,88 μm .

Tabla 24. Análisis de varianza de un factor para los pesticidas organoclorados y organofosforados con un tamaño de partícula de 0,88 μm (t= 30 minutos)

Pesticida	valor F	F crítico (95% de Confianza)	Valor de P
Heptacloro	1758,44	161,4	0,0000
Aldrin	1009,94		0,0010
Epoxyheptacloro CIS	1050,56		0,0000
Epoxyheptacloro TRANS	3,14		0,2186
Dieldrin	22,24		0,0421
Diazinón	698,65		0,0014

Malation	26,73		0,0354
Fenitrotión	24,28		0,0080
Etilparati3n	620,61		0,0016
Eti3n	160,20		0,6201

En esta tabla se observan valores de P menores a 0,05 para la mayoría de los pesticidas evaluados, indicando nuevamente que el análisis est3 sujeta al factor concentraci3n y que juega un factor importante para la recuperaci3n de los mismos.

En los pesticidas Eti3n y Epoxyheptacloro trans result3 no significativo la variable concentraci3n para su recuperaci3n durante el análisis. Si se observa la tabla 22 se encuentra que en ambos niveles de concentraci3n estos dos pesticidas presentan recuperaciones mayores al 70 % para un diámetro de partícula de 0.88 μm .

En la tabla 22 se evidencia para todos los dem3s pesticidas evaluados el aumento en el valor del porcentaje de recuperaci3n con el aumento del nivel de concentraci3n de enriquecimiento, indicando que esta es la que favorece el análisis.

Para todos los 10 pesticidas evaluados se obtuvo valores de porcentaje de recuperaci3n mayor al 71% cuando las variables tamaño de partícula y concentraci3n adquieren el mayor valor. Estos resultados afirman que la aplicaci3n del método de extracci3n QuEChERS es aceptable dando resultados comparables con los estudios realizados por otros investigadores [39].

Las tablas 25 y 26 muestran los valores de recuperaci3n obtenidos bajo las mejores condiciones de extracci3n para cada familia de pesticidas evaluados.

Tabla 25. Porcentajes de recuperación bajo las mejores condiciones de extracción para los pesticidas organoclorados.

Pesticida	%Recuperación 0,10 mg/kg; d = 0,88 μm (30min molienda)
Heptacloro	77,76 \pm 0,07
Aldrin	72,0 \pm 0,2
Epoxyheptacloro CIS	82,0 \pm 0,4
Epoxyheptacloro TRANS	81 \pm 1
Dieldrin	91,1 \pm 0,5

Tabla 26. Porcentaje de recuperación bajo las mejores condiciones de extracción para los pesticidas organofosforados.

Pesticida	%Recuperación 0,10 mg/kg; d = 0,88 μm (30min molienda)
Diazinón	90 \pm 2
Malatión	79 \pm 2
Fenitrotión	82 \pm 2
Etilparatión	95 \pm 1
Etión	90 \pm 2

El porcentaje de recuperación es el parámetro más útil para determinar la exactitud del método extractivo, QuEChERS es un método cuyas variables y etapas están bien

definidas es por ello que es un método efectivo, preciso y exacto para la obtención de la cantidad de cada pesticida agregado.

Si comparamos los resultados obtenidos usando el menor tamaño de partícula de la muestra y variando las concentraciones (Tablas 27 y 28) observamos que los resultados obtenidos muestran que las recuperaciones para los pesticidas organoclorados varían entre 33 y 79 % cuando la concentración es de 0,01 mg/kg mientras que se observa un incremento en los porcentajes de recuperación cuando la concentración es de 0,10 mg/kg obteniéndose valores de recuperación entre 72 hasta 91 %. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Ortega y col [41] los cuales evaluaron estas mismas concentraciones y obtuvieron mejores resultados cuando las muestras son fortificadas con 0,1 mg/kg de los pesticidas estudiados.

Tabla 27. Porcentajes de recuperación bajo las condiciones menos favorables de extracción para los pesticidas organoclorados.

Pesticida	%Recuperación 0,01 mg/kg; d = 1,20μm (15min molienda)
Heptacloro	0,0 \pm 0,0
Aldrin	33 \pm 1
Epoxyheptacloro CIS	40 \pm 5
Epoxyheptacloro TRANS	72 \pm 3
Dieldrin	79 \pm 3

Tabla 28. Porcentajes de recuperación bajo las condiciones menos favorables de extracción para los pesticidas organofosforados.

Pesticida	%Recuperación 0,01 mg/kg; d = 1,20μm (15min molienda)
Diazinón	44 \pm 2
Malatión	61 \pm 3
Fenitrotión	62 \pm 3
Etilparatión	71 \pm 3
Etión	66 \pm 4

Los resultados encontrados luego de aplicar el método de extracción con tamaño de muestra menor, muestran que para fortificaciones con la concentración de 0,01 mg/Kg la recuperación de los pesticidas organoclorados está entre 33 - 79% mientras que a 0,10 mg/Kg los porcentajes se encuentran entre 72 – 91%. En cuanto a los pesticidas fosforados cuando la concentración es de 0,01 mg/Kg el rango de recuperación es de 43 -71 % en el nivel de concentración mayor de 0,10 mg/Kg los valores arrojados van entre 79 – 94 % de recuperación.

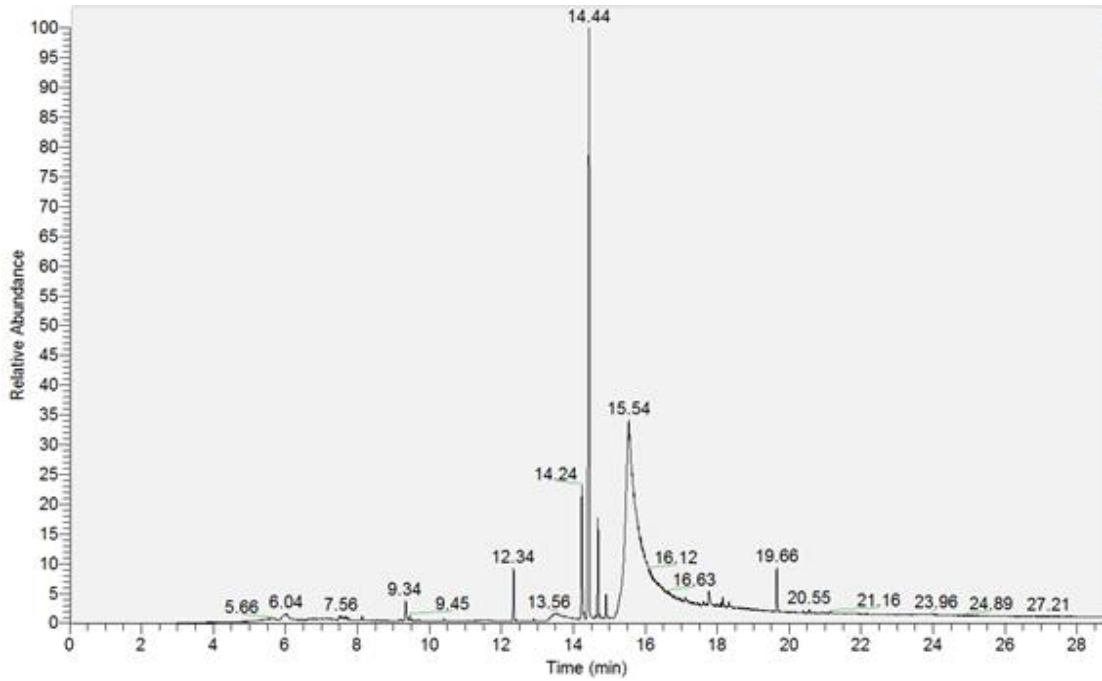
Estos resultados indican que es recuperable de la matriz de quinoa cada uno de los pesticidas estudiados cuando se trabaja en las condiciones óptimas, en ambas tablas es notoria que a medida que se trabaja a mayor concentración es más alto el porcentaje de recuperación obtenido y que el método fue menos eficiente cuando la muestra es sometida a moliendas de menor tiempo y a concentraciones bajas. Se aprecia también que el tiempo de molienda o tamaño de partícula tiene una relación directa con el compuesto a recuperar, a pesar de que los pesticidas organoclorados son menos sensibles de detectar que los fosforados, en ambos casos las recuperaciones de cada

compuesto se determinó observándose la misma tendencia de la influencia del tiempo y la concentración para todos los 10 pesticidas estudiados.

Las partículas que se tienen con el menor diámetro o tamaño son aquellas obtenidas con el mayor tiempo de molienda (30 minutos) y mostraron mayor recuperación para todos los pesticidas en la mayor concentración de análisis, el rendimiento es mayor dado que hay mayor extracción de pesticidas de la matriz de quinoa, esto se debe a que hay menor espesor de película que rodea al sólido, aumentando la transferencia del solvente (acetonitrilo) desde el seno de la solución hasta la partícula, favoreciendo la transferencia de masa por incremento de los coeficientes de transferencia de materia en la interfase sólido-líquido; por lo tanto mientras más pequeño es el tamaño de la partícula mayor es el rendimiento teniendo un efecto positivo sobre estos valores. [46]

Ahora bien, para la determinación de la presencia de estos agrotóxicos en la matriz de la quinoa se realizó el mismo protocolo de extracción QuEChERS para las muestras de quinoa venezolana y ecuatoriana con la intención de determinar la presencia o ausencia de los pesticidas estudiados. Para esta determinación se comparó los tiempos de retención expresados en la tabla #18 como los espectros de masas de cada pesticida (anexo 3), siendo esto la herramienta más útil para la identificación de los mismos ya que son específicos para cada compuesto en particular a lo que lleva a una identificación exacta.

En las figuras 17 y 18 se muestran los cromatogramas obtenido para las muestras de quinoa venezolana y ecuatoriana por el método de extracción QuEChERS.



. **Figura 7.** Extracción QuEChERS para la muestra de quinoa ecuatoriana.

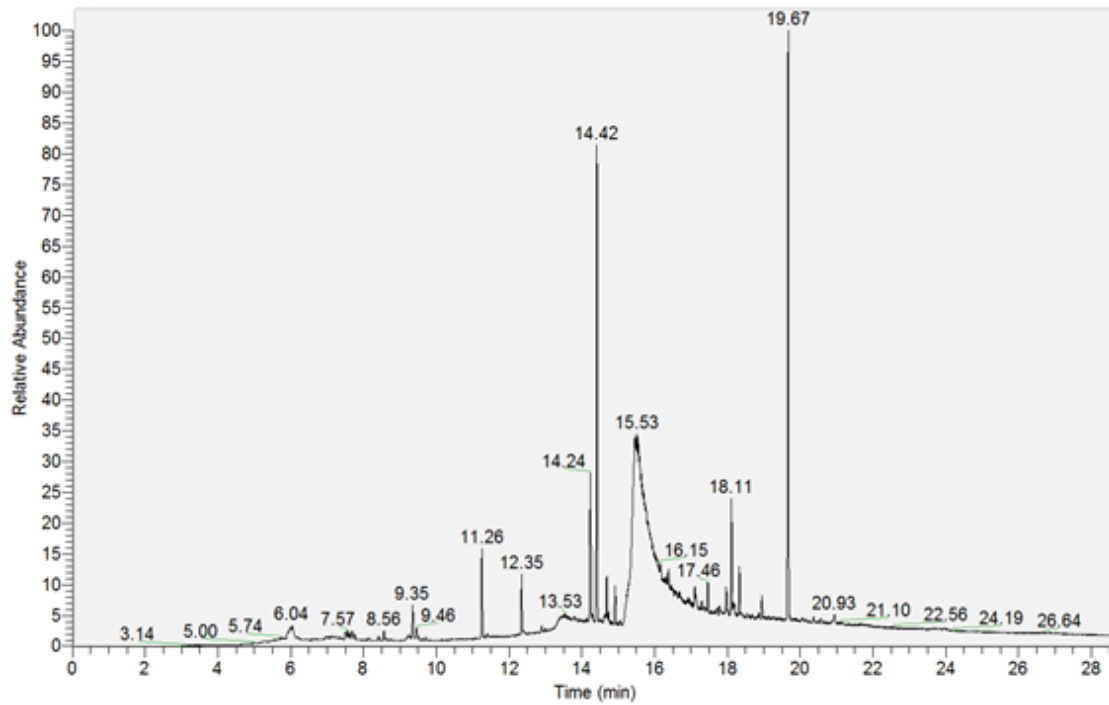


Figura 8. Extracción QuEChERS para la muestra de quinoa venezolana.

Para ambas muestras extraídas con QuEChERS se observa la ausencia de los pesticidas organoclorados y organofosforados estudiados, existe cierta similitud en los picos observados a tiempos de 14,24 minutos y entre 15,54 y 15,56 minutos con algunos pesticidas, más con la espectrometría de masas se corroboró que los iones generados no corresponden a los pesticidas evaluados si no a ácidos grasos presentes en la matriz de la muestra, es por ello que la ausencia de picos cromatográficos como de los espectros de masa indican que no hay residuos de los pesticidas evaluados en las muestras analizadas.

En la figura 9 se presenta una muestra de quinoa ecuatoriana enriquecida con los pesticidas evaluados para facilitar la visualización de los mismos sobre el cromatograma de la muestra.

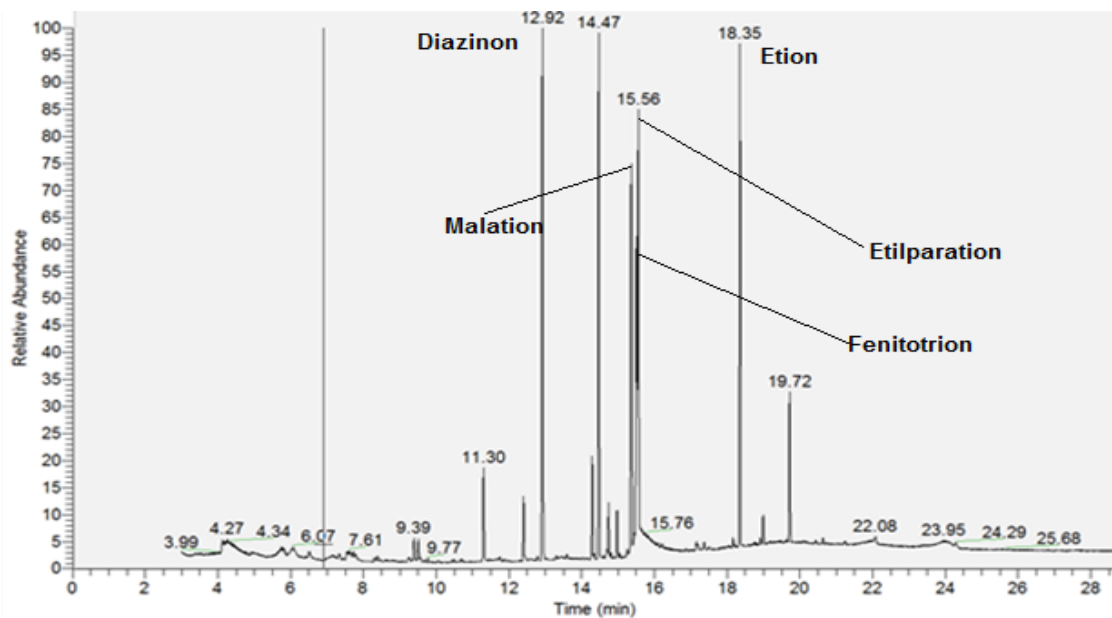


Figura 9. Muestra ecuatoriana fortificada con pesticidas y extraída por QuEChERS.

La quinoa como la mayoría de alimentos presentan una matriz muy compleja con una gran cantidad de compuestos orgánicos propios del pseudocereal, y se encuentran en forma natural y muchos de estos compuestos están asociados a beneficios a la salud, como lo son los ácidos de cadena larga, mejor conocidos como ácidos grasos. Alguno de estos compuestos son co-extraíbles en solventes orgánicos por lo que pueden estar presentes en el extracto resultante de la extracción QuEChERS y que pudieran corresponder a alguno de los picos que son los reflejados en las figuras 7 y 8.

La aplicación del método QuEChERS es favorable en el análisis de muestras de quínoa, dado que este ayuda a evitar la interferencia de los componentes de la compleja matriz de la muestra durante el análisis. Estas muestras presentan alto contenido de azúcares, altas concentraciones proteicas, presencia de saponinas y/o de grasas. Se encontró con los espectros de masas que estos componentes no interfirieron en la identificación y posterior cuantificación de los agrotóxicos utilizados, por lo que estas macromoléculas fueron perfectamente separadas y retiradas de las muestras mediante el proceso de clean up o limpieza con lo que se apreció que no hubo interferencia de componentes de la matriz de la muestra en los análisis realizados. Dado que se ha reportado que la adición de una mayor cantidad de adsorbentes para mejorar la limpieza mediante la adición controlada de PSA (Amina Primaria-Secundaria) genera extractos más limpios, sin comprometer los porcentajes de recuperación de compuestos lipofílicos (Mastovska et al. 2010), en esta investigación se realizó la limpieza utilizando cartuchos de 500 mg de PSA el cual representa una alta concentración de este compuesto por lo que era de esperar que la limpieza fuera más efectiva si lo comparamos con los resultados obtenidos por otros autores como Vilca que utilizo el método QuEChERS en granos de quinoa usando solo 50 mg del reactivo PSA [50]

Los porcentajes de recuperación obtenidos en los compuestos tanto organofosforados como organoclorados para las concentraciones de pesticidas añadidos de 0,10 mg/kg y con menor tamaño de partícula (0,88 μm) oscilaron entre un 72 - 91 % para los organoclorados y un 79 - 94 % para los organofosforados. Si comparamos estos resultados con los encontrados por Vilca y col en el 2012, observamos que estos autores lograron recuperaciones por ejemplo para el dieldrin de 34-112% al modificar las concentraciones desde 0,08 mg/kg hasta 0,4 mg/kg en atmosfera criogénica y variando el tamaño de partícula. Sus mejores recuperaciones la obtuvieron cuando la concentración era de 0,08 mg/kg y el tamaño de partícula era menor con moliendas realizadas por 30 minutos. A pesar de mantener condiciones de temperatura para evitar el calentamiento del sistema de molienda, los autores observaron que había pérdidas apreciables en la recuperación del compuesto a concentraciones menores de pesticida añadido, atribuyendo la buena recuperación de los compuestos solo al tamaño de partícula obtenido y a la concentración del pesticida añadido.

En el 2016 Ortega y col también consideraron el estudio de algunos pesticidas organoclorados entre los cuales analizaron el heptacloro, modificando las concentraciones de pesticida añadido, ellos evaluaron las concentraciones añadidas de 0,01 mg/kg y 0,1 mg/kg obteniéndose % de recuperación de 128% para la concentración de 0,1 y de 103% para la de 0,01 lo que difiere con los resultados de Vilca y col ya que estos autores obtuvieron recuperaciones de 145 % cuando la concentración añadida era de 0,08 mg/kg. Resultados similares a los encontrados por Ortega y col, fueron obtenidos en esta investigación para los pesticidas dieldrin y el heptacloro donde se aprecia que las recuperaciones son mejores cuando la concentración de pesticida añadido es de 0,1 mg/kg. De estos resultados se infiere que la variable concentración de pesticida añadido debe ser considerada como una variable determinante en los estudios de recuperación de pesticidas en alimentos, ya que representa un compromiso cuando las concentraciones añadidas son muy altas o muy bajas. Por otra parte cabe destacar

que estos autores realizaron su trabajo usando como solvente de extracción el acetato de etilo el cual posiblemente permitió mejor eficiencia en la recuperación de los compuestos analizados.

Se realizó un estudio posterior a las muestras de quinoa ecuatoriana y venezolana con el fin de verificar la presencia de los pesticidas establecidos en quinoa bajo la Comisión Europea (tabla 16) y no se observó la presencia de estos agrotóxicos en las muestras estudiadas.

8) CONCLUSIONES:

- La molienda de las muestras de quinoa influyó en los valores de recuperación de los pesticidas organoclorados y organofosforados, en muestras con diámetros de partículas más pequeños que fueron producidos por moliendas más largas arrojó mejores porcentajes de recuperación de todos los pesticidas, indicando que la molienda tiene una relación directa con la recuperación de los compuestos.
- El método de extracción QuEChERS fue preciso y exacto para los 10 pesticidas estudiados a la concentración de pesticidas añadidos de 0,10 mg/Kg y a un tamaño de partícula pequeño, obteniéndose recuperaciones mayores al 72%, con valores de CV menores o iguales al 5%.
- El diseño de análisis de varianza ANOVA de un factor arrojó que el efecto de concentración fue importante con $P < 0,05$ para los pesticidas Heptacloro, Aldrin, Diazinón, Epoxyheptacloro cis, Malation, Fenitrotión y Etión para el tamaño de muestra de 1, 2 μm . Con este tamaño de muestra no fue importante el efecto de concentración para los pesticidas epoxyheptacloro trans, dieldrin y etilparatión, Mientras que para un tamaño de muestra de 0,8 μm solo los pesticidas epoxyheptacloro trans y etión no mostraron efecto con el cambio de concentración.
- No se detectó la presencia de los pesticidas organoclorados ni organofosforados estudiados en las muestras de quinoa venezolana ni ecuatoriana, esta verificación se hizo en base a los tiempos de retención de cada uno de los picos cromatográficos observados así como de los espectros de masa de cada pesticida.
- La cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas es una técnica sensible y versátil que permitió obtener mejores límites de detección y

cuantificación en muestras de quinoa comparados con los reportados por otros autores con otras técnicas de análisis.

- Es posible medir simultáneamente los pesticidas organoclorados y organofosforados estudiados en muestra de quinoa de diferente procedencia usando el método QuEChERS con la técnica de análisis GC-MS.

9) RECOMENDACIONES:

Es recomendable en próximas investigaciones realizar un diseño de experimento que considere las variables tamaño de partícula, concentración de pesticida añadido, cantidad de PSA agregado y el tipo de solvente de extracción, a fin de evaluar simultáneamente el efecto de las posibles variables que afecten la recuperación de los analitos estudiados y poder discernir con certeza los parámetros que permitan obtener eficientemente la recuperación de los mismos a bajas concentraciones.

10) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- [1] Ministry of agriculture and land, Government of British Columbia. U.S.A http://www.agf.gov.bc.ca/pesticides/c_2.htm. Consultado el 13 de octubre de 2018.
- [2] Mujica A, Jacobsen S.E, Izquierdo J, Marathe J. P. [Quinoa \(Chenopodium quinoa Willd\), Ancestral cultivo andino, alimento del presente y futuro](#) FAO. Santiago de Chile. 2001.
- [3] INE-Bolivia. Información Estadística por actividad económica (agricultura). La Paz Bolivia. 2015. Consultado en octubre de 2017. Disponible en: <http://www.ine.gob.bo/indice/indice.aspx?d1=0201&d2=6>.
- [4] (International program of chemical safety & environmental health Criteria: Principles for the toxicological assessment of pesticide residues in food, World Health Organization WHO (Nueva York, Estados Unidos de America) Referencia: 2006, 152p. disponible desde: WHO, United Nations Organization.
- [5] NEBEL B, WRIGHT RT. 'El control de plagas. Promesas y problemas de los métodos químicos', en Ciencias ambientales: ecología y desarrollo sostenible, Prentice Hall, México. 1999.
- [6] Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización Panamericana de la Salud (OPS), División Salud y Ambiente. Plaguicidas y salud en las Américas, Washington: OMS/OPS, 1993.
- [7] Koziol M.J. Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (Chenopodium quinoa Wild). J. Food Comp. Anal. México. 1992. p: 36-68.
- [8] Asociación Latinoamericana de Integración (ALADI). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Tendencias y perspectivas del comercio internacional de Quinoa. 2014.

- [9] Johnson C. Quinoa production in Colorado Service-in-Action No 112. Colorado State Uni Coop. Fort Collins. 1985.
- [10]. Tapia M. Cultivos andinos sub-explotados y su aporte a la alimentación. FAO. Santiago de Chile. 2000. Segunda Edición, p: 312-342.
- [11] Plaza M. Brasil abriría su mercado a la cebolla, quinua y kiwicha de Perú. Puno, Perú. 2010. Consultado en octubre de 2017. Disponible en <http://lgestion.pe/noticia/327734/brasil-abriria-su-mercado-cebolla-quinua-ichaperuanas>.
- [12] Fierro C. Quinoa el grano madre en Venezuela. Caracas. 2011. Consultado en octubre de 2017. Disponible en <http://chefcarlosfierro.blogspot.com/2013/08/la-quinua-en-venezuela.html>
- [13] Ibañez E. La siembra de la quinua. Caracas. 2014. Consultado en agosto de 2017. Disponible en <https://ernesto-consultoria.blogspot.com/2014/10/la-siembra-de-la-quinua.html>.
- [14] FAO. International code of conduct on the distribution and use of pesticides. Mexico. 2002, consultada en Agosto de 2017 disponible en: <http://www.fao.org/DOCREP/005/Y4544E/y4544eOO.htm>
- [15] Smith AG. Chlorinated hydrocarbon Insecticides. Academic Press. ER, editors. Handbook of pesticides toxicology. San Diego. 1991, p: 731-915.
- [16] Jeyaratnman J, Maroni M. Organophosphorous compounds. Toxicology. Washington 1994. P: 91: 15-27.
- [17] Bey TA. Sullivan JB. Walter FG. Organophosphates and carbamate insecticides. Krieger GR, editors. Clinical Environmental Health and Toxic Exposures. Philadelphia: Lippincott William and Wilkins, 2001. p: 1046-1057.
- [18] Hayes WJ. Chlorinated hydrocarbons insecticides. Lawes ER, editors. Pesticides studied in Man. San Diego: Academic Press, 1991. p: 731-868.

[19] Worting C. Walker S.B. ALDRIN Y DIELDRIN. Guía para la salud y la seguridad. Programa Internacional de seguridad de las sustancias Químicas. Metepec, Mexico, (1996) pp (1-26).

[20] WHO/IARC. CHLORDANE AND HEPTACHLOR. Washington.2001. Group 2B VOL.: 79. p. 411. Consultada en octubre de 2017. Disponible en <http://monographs.iarc.fr/past&future/evaltab79fr.html>

[21] Eto M. Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry. CRC Press Inc., Cleveland, 1974. P: 387-412.

[22] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Diazinon. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 2008.

[23] Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). Reseña Toxicológica de los Etión. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública. 2000.

[24] Aldridge W N. The toxicological properties of impurities in Malathion. Arch. Toxicol. Washington. 1979. (42), pp. 95-106.

[25] Ugaki M. Shono T. Fukami J. Metabolism of fenitrothion by organophosphorus resistant and susceptible house flies, musca domestica L. Pesticide biochemistry and physiology. Atlanta. 1985. (23). pp. 33-40.

[26] Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). Reseña Toxicológica del metilparatión (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública. 2001. (24) pp: 65-73.

[27] Embrapa J. Cultivo para industrializacáo. Gama: Embrapa Hortalic;as,(2003). Consultada en septiembre de 2017. Disponible en

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapabr/FontesHTMLITomate/TomateIndustrial/index.htm>

[28] Soboleva E. Karam A.; Ambrus A.. Applicability of some mass spectrometric criteria for the confirmation of pesticide residues. *The Analyst*, London. 2004. (129), p.1123-1129.

[29] Alder L. Greulich K. Kempe G. Vieth B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by CG-MS or LC-MS/MS? *Mass Spectrometry Reviews*, Malden. 2006. (25), p.838-865.

[30] Anastassiades M. Scherbaum E. Sample handling and clean-up procedures. *New developments Chromatographic-mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residues*. Amsterdam: Elsevier. 2005. Cap. 4, p. 113-233.

[31] Lacorte S. Fernandez A.R. Sample introduction techniques. In: FERNANDEZ-ALBA, A.R. (Ed.). *Chromatographic-mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residues*. Amsterdam: Elsevier. 2005. (5), p.235-267

[32] AOAC Official Method 2007:01. "Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate".

[33] Anastasiades M. Lehotay S.J. Stajnbaher D. Schenck, F. "Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraccion/partitioning and "dispersive solid-phase extration" for the determination of pesticide residues in produce". *Journal of AOAC International*. Atlanta. 2003. (2). p:412-430.

[34] Skoog D. Holler J. Nieman T. *Principios de Análisis Instrumental*. 5° edición. Madrid. 2001. P: 12-16.

[35] <https://investigaciones.uniandes.edu.co/es/microscopio-electronico-de-barrido-meb/>
MEB vicerrectoría de investigaciones de la Universidad de los Andes, Bogota Colombia.
Consultada el 13/10/18.

- [36] <https://sstti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-microscopia/microscopia-electronica-de-barrido.html> Microscopia Electrónica de Barrido de la Universidad de Alicante Servicios Técnicos de Investigación, Alicante, España. Consultada el 14/10/18.
- [37] [https:// http://mty.cimav.edu.mx/sem/](https://http://mty.cimav.edu.mx/sem/) CIMAV Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C, Microscopía Electrónica de Barrido. Ciudad de México.
- [38] Pierre F, Betancourt P. Residuos de plaguicidas organoclorados y organofosforados en el cultivo de cebolla en la depresión de Quíbor, Venezuela. Bioagro. 2007. ISSN 1316-3361. v 19. n.2.
- [39] Vilca Zirena F. Evaluación del método QuEChERS para la cuantificación en agrotóxicos en quinoa (*Chenopodium quinoa* Wild). Perú. 2010.
- [40] Ahumada D. Zamudio A. Análisis de residuos de plaguicidas en tomate mediante el uso de QuEChERS y cromatografía líquida ultrarrápida acoplada a espectroscopia de masas. Rev. colomb. quim., Volumen 40, Número 2, p. 227-246, 2011. ISSN electrónico 2357-3791. ISSN impreso 0120-2804.
- [41] Vilca Zirena F. Torres N. Nazato C. Tomisielo V. Effect of the particle size of the quinoa simple (*Chenopodium quinoa* Wild) on the validation process of the QuEChERS method for seven pesticides using GC-ECD. Br J Anal Chem 2012, 08, 352–357.
- [42] Pérez R. Evaluación de diferentes métodos de extracción para la determinación de pesticidas en fresas empleando la cromatografía de gases con espectrometría de masas. [Tesis de grado]. Caracas: Universidad Central de Venezuela; 2013.
- [43] Barriga R. Zamalloa W. Tornisiel V. Vilca Zirena V. Determinación de pesticidas organoclorados en granos de quinoa orgánica (*Chenopodium quinoa* Wild) por GC-ECD utilizando el método QuEChERS. Rev. Investig. Altoandin. 2016; Vol 18 N° 1: 19 – 26
- [44] <https://spa.download-org.com/statgraphics-centurion-xvii-i-x64-espa-o>, programa de la empresa StatPoint Technologies, Inc. *StatGraphics Centurion XVII* ® Versión 16.2 32

bits (programa de computadora); requerimientos del sistema Pentium IV 500 MHZ o superior, 2 GB RAM; soporta cualquier versión de Windows XP, Windows ME, Windows 2000, Windows Vista y Windows 7, disponible en versión de 64 bits.

[45] Salas Janeth, Benzo Zully, Rodriguez Leonardo. Diseño factorial para la optimización de las condiciones experimentales para la determinación de Rutenio por espectroscopia de absorción atómica por llama (Trabajo Especial de Grado), mayo de 1995, Universidad del Zulia.

[46] “Influencia del tamaño de partícula y velocidad de agitación sobre el rendimiento de pectina”. Universidad de Camaguey. Camaguey – Cuba. Revista Cubana de Farmacia. Versión On line ISSN 1561-2988.

[50] Mastovska K. Dorweiler K. Lehotay S. Wegscheid J. Szpylka K. Pesticide Multiresidue Analysis in Cereal Grains Using Modified QuEChERS Method Combined with Automated Direct Sample Introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS Techniques. Journal of Agricultural and food Chemistry Article. 2010, 58, 5959-5972. DOI: 10.1021/jf9029892.

[51] Vilca Zirena F, Rossi G, Andrade Moura, Zamalloa Cuba W, Tornisielo Valdemar L. Determination of pesticides residues in quinoa (*Chenopodium quinoa Wild*) using QuEChERS and LC-MS. Emirates Journal of Food and Agriculture. 2018. 30(5): 421-427. DOI: 10.9755/ejfa.2018.v30.i5.1683.

[52] Miller J, Miller J. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4° Edición. Universidad Complutense de Madrid, Pearson Educación, S.A, España. 2002.

11) ANEXOS

1. Curvas de calibración de los pesticidas organoclorados y organofosforados analizados.

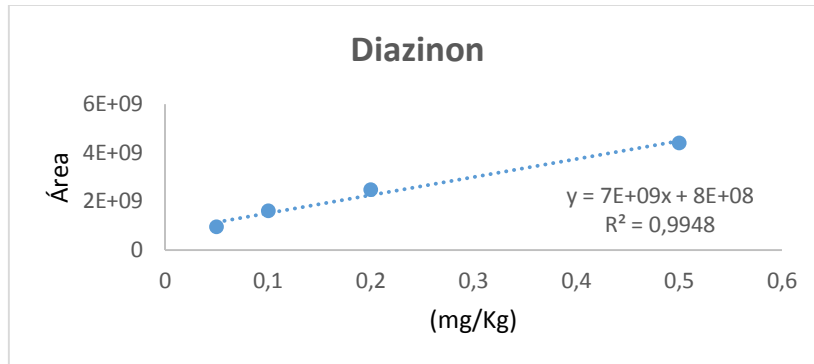


Gráfico 1. Curva de calibración del compuesto Diazinón.

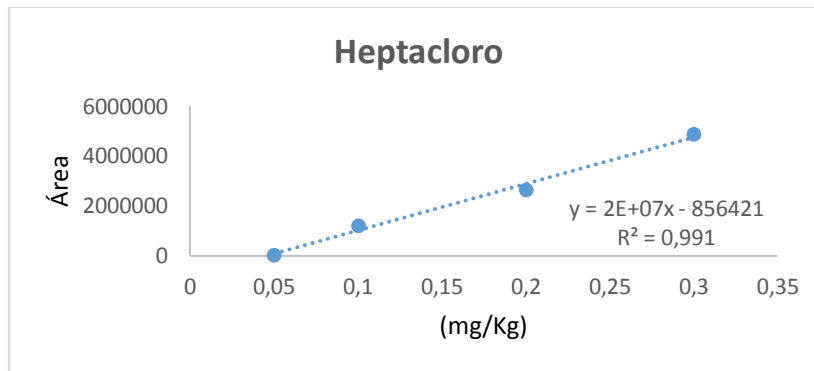


Gráfico 2. Curva de calibración del compuesto heptacloro.

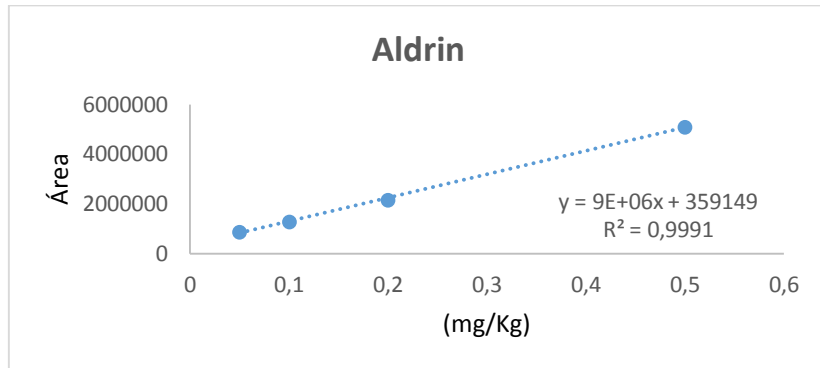


Gráfico 3. Curva de calibración del compuesto Aldrin

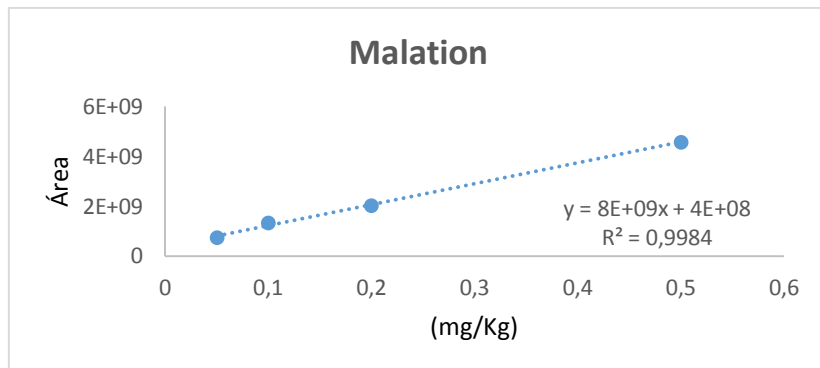


Gráfico 4. Curva de calibración del compuesto Malatión

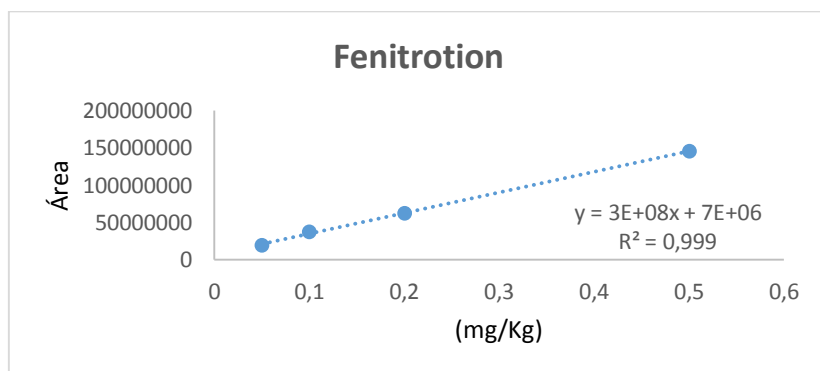


Gráfico 5. Curva de calibración del compuesto Fenitrotión.

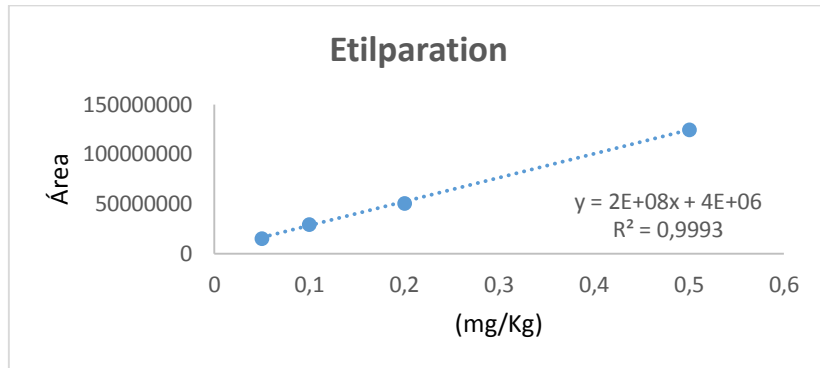


Gráfico 6. Curva de calibración del compuesto Etilparati6n.

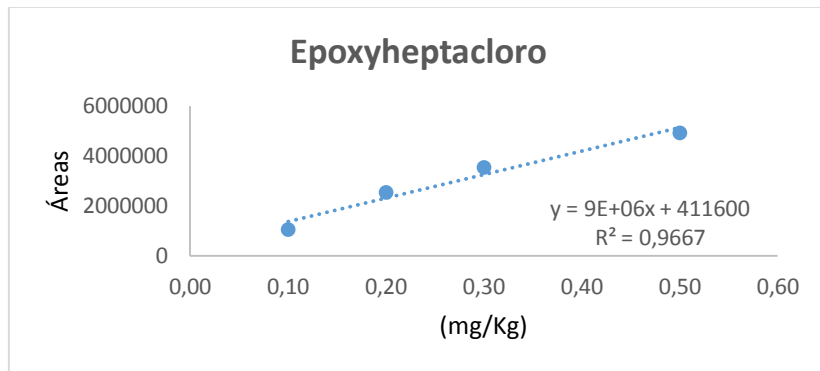


Gráfico 7. Curva de calibración del compuesto Epoxyheptacloro Cis.

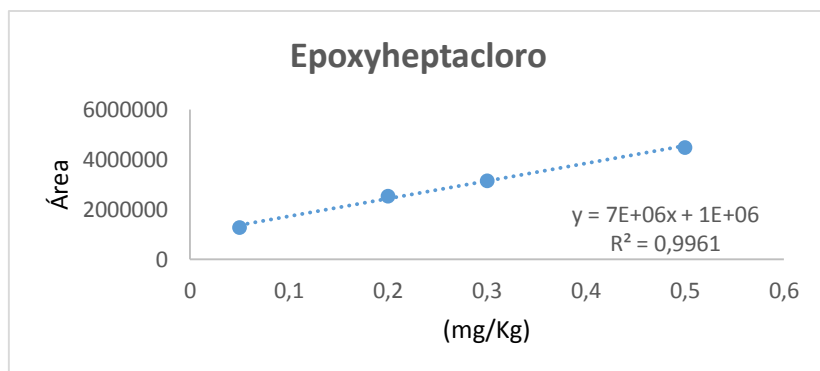


Gráfico 8. Curva de calibración del compuesto Epoxyheptacloro Trans.

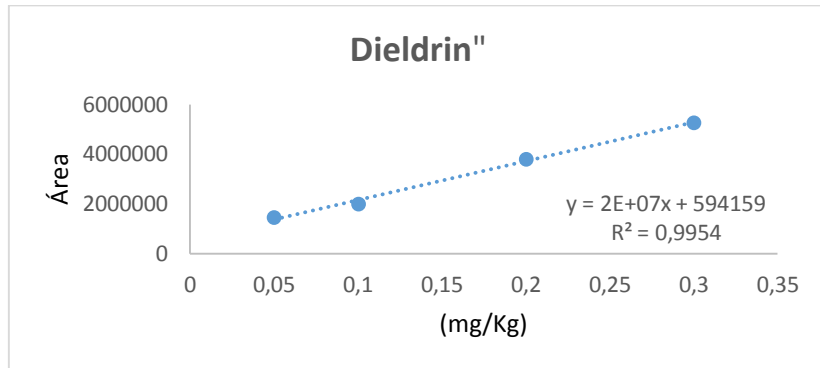


Gráfico 9. Curva de calibración del compuesto Dieldrin.

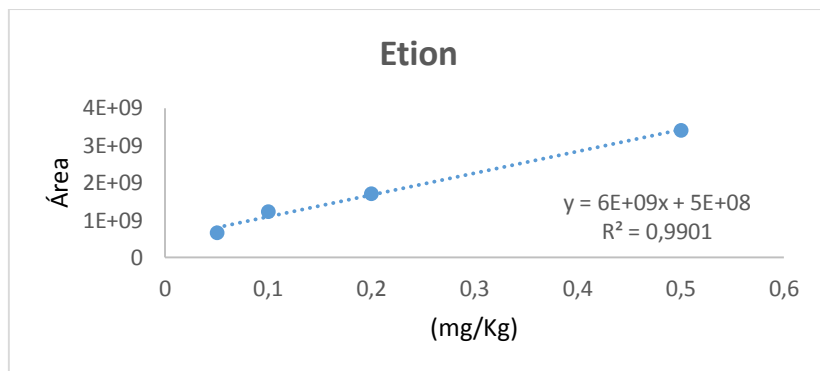
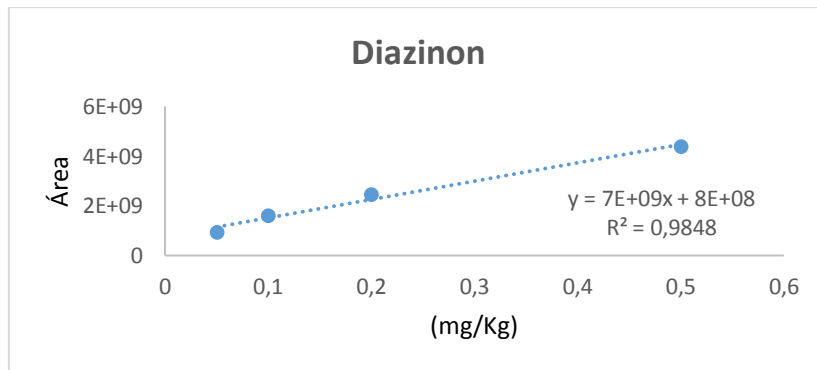


Gráfico 10. Curva de calibración del compuesto Etión.

2. Modelo de cálculo para la obtención de cada pesticida organoclorado y organofosforado analizado. Usando como ejemplo el cálculo del porcentaje de recuperación del pesticida Diazinón.

A partir de la curva de calibración obtenida de área en función de la concentración de los patrones preparados se determina la concentración de pesticida extraídos de la matriz de quinoa, despejando la variable x de la ecuación de la recta obtenida:



$$y = 7 \cdot 10^{09}x + 8 \cdot 10^{08}$$

$$x = \frac{y - 8 \cdot 10^{08}}{7 \cdot 10^{09}}$$

Donde "y" es el área obtenida cromatográficamente en las muestras de quinoa fortificadas con los pesticidas

$$y = 1,561 \cdot 10^{09} \rightarrow x = \frac{1,561 \cdot 10^{09} - 8 \cdot 10^{08}}{7 \cdot 10^{09}}$$

$$x = 1,09 \cdot 10^{09} \frac{mg}{L} \text{ de diazinon en la muestra}$$

La determinación del porcentaje de recuperación se hizo para muestras de molienda de 15 y 30 minutos y para concentraciones de 0,01 mg/Kg y en 0,10 mg/kg; en este ejemplo se realizó el cálculo en los valores de tiempo y concentración más bajos:

Para las muestras fortificadas con 0,01 mg/Kg y en (5,0045 ± 0,0001) g de quinoa analizadas se tiene que hay 0,00005 mg/g de pesticida organofosforado a esa concentración en esa muestra de quinoa.

$$ppm = \frac{mg}{L} \rightarrow mg = ppm \cdot L$$

Ahora se determinó los gramos de diazinón extraídos en 10 mililitros de Acetonitrilo utilizado por cada 5 gramos de quinoa:

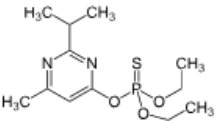
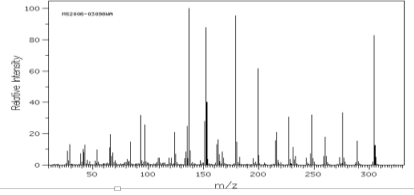
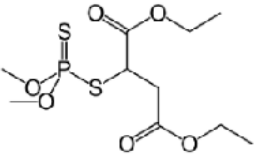
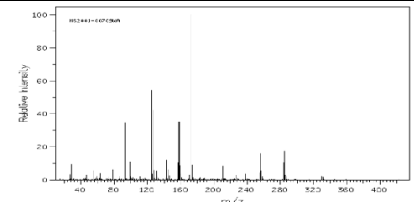
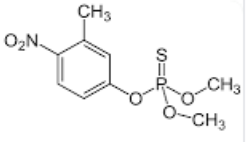
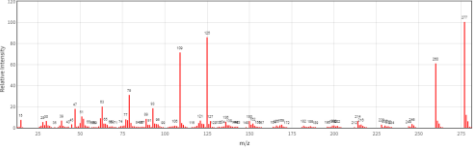
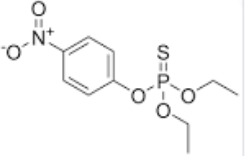
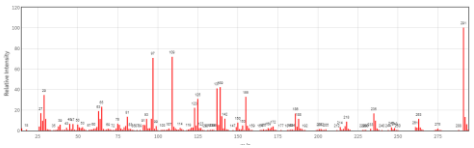
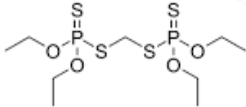
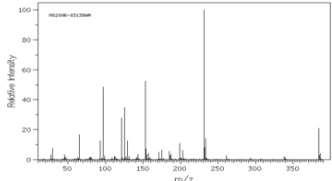
$$Diazinon \left(\frac{mg}{L} \right) = 1,09 \cdot 10^{09} \frac{mg}{L} \cdot \frac{10 mL}{1000 mL} \cdot 1 L = 0,0002175 mg$$



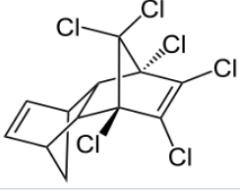

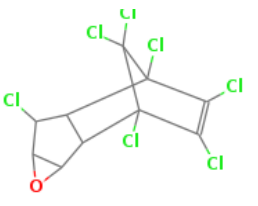
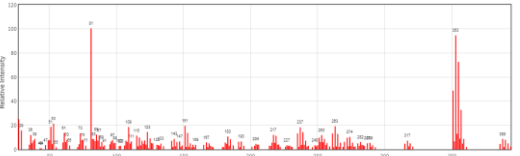
A partir de saber los gramos de diazinón obtenidos se determinaron el porcentaje de recuperación del mismo en la muestra de quinoa:

$$\% Recuperacion = \frac{mg \text{ de diazinon obtenidas}}{mg \text{ de pesticida fosforado en la muestra}} \cdot 100\%$$

$$\% Recuperación = \frac{0,0002175 mg}{0,00005 mg} \cdot 100\% = 43,50 \%$$

Tabla 29. Tabla de iones moleculares y espectro de masas de cada pesticida estudiado.

Nombre	Peso molecular (g/mol)	Ion molecular	Estructura	Espectro de Masas
Diazinón $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	304,35	304		
Malatión $C_{10}H_{19}O_6PS_2$	330,36	330		
Fenitrotión $C_9H_{12}NO_5PS$	277,23	277		
Etilparatión $C_{10}H_{14}NO_5PS$	291,30	291		
Etión $C_9H_{22}O_4P_2S_4$	384,48	384		

<p>Heptacloro C₁₀H₅Cl₇</p>	<p>373.32</p>	<p>372</p>		
<p>Aldrin C₁₂H₈Cl₆</p>	<p>364,9</p>	<p>362</p>		
<p>Epoxyheptacloro C₁₀H₅Cl₇O</p>	<p>389,30</p>			
<p>Dieldrin C₁₂H₈Cl₆O</p>	<p>380,9</p>	<p>378</p>	