

CIENTIA



Depósito Legal ppi 201502ZU4668

Vol. 23, N° 3

Julio-Septiembre 2015



**An International Refereed Scientific Journal of
the Facultad Experimental de Ciencias
at the Universidad del Zulia
Maracaibo - Venezuela**

Esta publicación científica en formato digital
es continuidad de la revista impresa
Depósito Legal: pp 199302ZU47
ISSN:1315-2076

CIENCIA 23 (3), 158-167, 2015
Maracaibo, Venezuela

Comparación de dos métodos de extracción para la determinación de pesticidas organoclorados y organofosforados en fresas

Rafael Pérez², Janeth salas^{1,} y Rosa Amaro².*

¹Laboratorio de Espectrometría de Masas, Centro de Química, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC. Apartado Postal 21827, Caracas-1020-A, Venezuela. ²Laboratorio de Métodos Cromatográficos. Centro de Química Analítica, Escuela de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Apartado 47102. Código Postal 1041-A Caracas – Venezuela.

Recibido: 20-01-15 Aceptado: 15-07-15

Resumen

Se realizó un estudio comparativo para la extracción de pesticidas organoclorados y organofosforados, en muestras de fresas provenientes del sector Cumbote de la población de la Colonia Tovar del estado Aragua, aplicando los métodos de extracción microondas y QuEChERS. Para la evaluación de las variables más importantes en el método de extracción por microondas se utilizó un diseño factorial 2³, evaluando las variables: tiempo, temperatura de extracción y concentración de pesticida. En los resultados obtenidos se encuentra que el método QuEChERS es preciso, exacto y sencillo de aplicar, generando extractos limpios y recuperaciones mayores a 86%, mientras que la extracción por microondas arroja porcentajes de recuperación por encima del 90% para todos los pesticidas evaluados.

Palabras clave: QuEChERS; Extracción; Microondas; Pesticidas; Cromatografía.

Comparison of two methods of extraction for the determination of pesticide organochlorines and organophosphorus in strawberries.

Abstract

A comparative study was performed for the extraction of organochlorine pesticides and organophosphates was performed on samples of strawberries from the Cumbote sector of the population of Colonia Tovar, Aragua state. For the evaluation of the most important variables in the microwave extraction method was used a factorial design 2³, evaluating the variables: time and temperature of extraction and sample amount. The results showed that the QuEChERS method is precise, accurate and simple to generating more clean extracts and recoveries to 86%, while the microwave extraction throw recoveries above 90% for all pesticides evaluated.

Keywords: QuEChERS; Extracción; Microwave; Pesticides; Chromatography.

* Autor para la correspondencia: Jsalsas@Ivic.gob.ve

Introducción

Los pesticidas o plaguicidas se han usado a lo largo de los años como agentes para el control de vectores de parásitos, insectos y enfermedades que afectan los sembradíos de alimentos (1). Debido a que la mayoría de los pesticidas son compuestos de origen orgánico, estructura química muy estable y extremadamente tóxicos a bajas concentraciones, se les clasifica en la categoría de Compuestos Orgánicos Persistentes (COPS), por tanto su uso inadecuado trae consecuencias negativas sobre la salud y el ambiente. En Venezuela la regulación de pesticidas adquiere importancia debido a la alta actividad agrícola ejercida en zonas rurales del país (2), por lo que se ha estudiado las zonas donde se ejerce una gran actividad de aplicación de pesticidas y se han evaluado las consecuencias ambientales, sociales y de salud que esto acarrea (3). La determinación de los residuos de pesticidas en alimentos, específicamente en frutos y vegetales, es necesaria debido a que los mismos usualmente no son tratados como los alimentos empacados y se distribuyen directamente del productor al consumidor. La evaluación del impacto de un pesticida en la cadena alimenticia es un proceso complejo, ya que un herbicida aplicado a un solo cultivo puede acabar, en función de su persistencia, en distintos grupos ambientales como alimentos, suelos, plantas, reservorios de agua, entre otros; afectando a diferentes organismos, como: insectos, ganado, seres humanos e inclusive otros cultivos. Estos hechos han desencadenado una preocupación social que está motivando el uso de menores dosis de aplicación y la utilización de sustancias menos tóxicas, menos persistentes y más compatibles con el medio ambiente. La demanda de la sociedad de una mayor seguridad en el uso de los productos fitosanitarios requiere el desarrollo y mejora de la metodología analítica para garantizar la detección de estos compuestos, a niveles muy bajos, en las distintas matrices ambientales y alimentarias. El análisis de residuos y contaminantes en los alimentos supone la determinación de sustancias que se encuentran en cantidades muy pequeñas hasta del orden de $\mu\text{g}/\text{kg}$, en matrices muy complejas. La determinación química de estos compuestos requiere de diversos procedimientos laboriosos como extracción, purificación y cuantificación que

trae como consecuencia en algunos casos pérdida significativas de los mismos. Los procedimientos tradicionales de extracción son tediosos, consumen largos tiempos y envuelven el uso de grandes volúmenes de solventes orgánicos (4)

Recientemente, en la literatura se ha reportado diferentes métodos modernos de extracción como: micro extracción en fase sólida, extracción con fluidos súper crítico y extracción asistida por microondas, los cuales reducen el tiempo de análisis, permiten poca manipulación de la muestra y minimizan el volumen del solvente.(5). También, se ha reportado el uso del método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), siendo este según sus siglas; rápido, fácil, económico, efectivo, robusto y seguro (6). Este nuevo método de preparación de muestras surgió de la necesidad de desarrollar métodos multiresiduos rápidos y económicos que proporcionen resultados de gran calidad y fiabilidad. (6-7)

El método QuEChERS es muy aplicado a nivel mundial para la determinación de residuos de pesticidas en alimentos, debido a las múltiples ventajas que presenta, sin embargo no ha sido establecido como método oficial de análisis. Por otro lado la extracción asistida por microondas es un método útil debido a que se logran recuperaciones muy altas por ser sistemas cerrados, se emplea poca cantidad de solventes y poco tiempo de extracción. (6-8).

Investigaciones recientes(9-11) han demostrado que las fresas presentan alto niveles de vitamina C, ácido fólico y constituyentes fenólicos, esto aunado a su agradable sabor, motiva su consumo en todo el mundo, sin embargo, son escasos los estudios de residuos de pesticidas en fresas que se han publicado a nivel mundial. En Venezuela son pocas las publicaciones relacionadas con el análisis de pesticidas en frutas y alimentos, por ello es de suma importancia iniciar las investigaciones para la determinación de contaminantes orgánicos tipo pesticidas en fresas y otros frutos en Venezuela.

En el presente trabajo de investigación se comparará los métodos de extracción QuEChERS y asistida por microondas (MAE) para la determinación

de los pesticidas: Aldrín, y Heptacloro (familia de los organoclorados) Malatión y Metilparatión (familia de los organofosforados) en fresas (*fragaria Vesca L*) provenientes del sector Cumbote en la Colonia Tovar, Municipio Tovar del estado Aragua, usando técnica de Cromatografía de gases con detección de masas (GC-MS).

Parte experimental

Materiales y reactivos.

Se utilizaron estándares de pesticidas marca Polyscience Corporation Niles, Illinois USA, de alta pureza. Acetonitrilo grado HPLC J.T Baker Chemical Co. Phillisburg USA. Tolueno grado HPLC Sigma-Aldrich. Cartuchos de extracción en fase sólida C₁₈ marca Waters Associates ® modelo SEP-PAK. Cartuchos de amina primaria secundaria marca Agilent technologies ® Bond Elut PSA 500mg. NaCl grado analítico de Merck Corporation. MgSO₄ anhidro grado analítico J.T Baker Chemical Co. Phillisbug USA.

Area de muestreo

El área de estudio seleccionada es el sector Cumbote de la población de la Colonia de Tovar. Se ubica a 42 Km de la Capital de Venezuela a una altitud de aproximadamente 2200 metros sobre el nivel del mar.(12)

Tratamiento de muestra

Se trabajó con dos tipos de muestras, la primera corresponde a una muestra denominada "muestra general" la cual fue suministrada por los productores del aérea de muestreo, esta muestra tuvo un peso de aproximadamente 600 g y fue empleada para realizar los estudios de recuperación para los diferentes métodos de extracción evaluados a través de la adición controlada de pesticidas. El segundo tipo de muestra fue obtenida a través del proceso de muestreo del Codex Alimentarius (13) en el área de muestreo y es denominada "muestra representativa", a esta muestra se le aplicó la condición óptima de la extracción asistida por microondas y QuEChERS con el objeto de determinar los pesticidas presentes en la zona muestreada.

Para la muestra representativa (lote único 103x75 m de 1,5 Kg) su captación fue realizada después de una semana de la aplicación de pesticidas en el campo. Como precaución se evitó la contaminación y el deterioro de la muestra en todas las fases de muestreo, preservándola de la luz solar, manteniéndola refrigerada para así evitar alteraciones de los resultados analíticos (13).

Las muestras de fresas fueron trituradas y homogeneizadas en un mortero con mazo de cerámica, posteriormente fueron transferidas a un envase de vidrio color ámbar para evitar la degradación de algunos pesticidas vía fotoquímica, finalmente las muestras fueron congeladas a una temperatura de -18°C y se mantuvieron guardadas bajo estas condiciones hasta el momento de su análisis.

Preparación de patrones y curvas de calibración:

A partir de los estándares de pesticidas Metilparation, malation, heptacloro y aldrin, se prepararon soluciones patrones de cada uno de ellos a concentraciones de: 1, 5, 10, 15, 20 y 25 mg/L, adicionalmente se agregó el compuesto Phorate que es un pesticida organofosforado con características similares al malation y metilparation, como estándar interno a una concentración constante de 10 mg/L para cada uno de estos patrones.

Metodología de extracción.

Para evaluar el método de extracción asistida con microondas se empleó un diseño factorial 2³, el cual permite el estudio del efecto, sobre la respuesta del sistema, de varias variables al mismo tiempo. El diseño factorial 2³ genera 8 experimentos que con sus replicas da lugar a 16 experiencias. (Tabla 1). En este experimento se evaluaron tres variables o factores: tiempo(**A**), temperatura (**B**) y concentración añadida de pesticida (**C**), a dos niveles para cada variable designados con signo (-) y (+). Para el nivel (-), (**A**)= 5 minutos, (**B**)= 40 °C y (**C**) = 50mg/Kg, para el nivel (+), (**A**) 10 minutos, (**B**)= 60 °C y (**C**) = 100 mg/Kg.

Tabla 1

Diseño experimental 2³ empleado para optimizar las condiciones experimentales por microondas con sus respectivas respuestas para cada pesticida evaluado

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

Para la extracción se usó un equipo microondas marca CEM modelo Mars5 de control programable y con potencia máxima de 1200 Watts. En el estudio se tomó 1 g de muestra previamente triturada y homogenizada, se colocó en el envase del dispositivo de microondas y se añadió 10 mL de acetonitrilo como solvente de extracción. Finalmente se colocó en el microondas bajo las condiciones indicadas por el diseño experimental 2³ (tabla 1). Para eliminar interferentes y otros componentes se empleó cartuchos de extracción en fase sólida C₁₈ marca Waters Associates ® modelo SEP-PAK. El extracto obtenido se preconcentró a través de un rota evaporador marca Büchi N° 311670, a una temperatura de 40 °C, una velocidad de 110 rpm. Finalmente se llevó a un volumen final de 5 mL con tolueno para luego ser inyectado al GC-MS

Para el método de extracción QuEChERS, se pesó 5 g de muestra, previamente triturada y homogenizada se enriqueció con los pesticidas organoclorados y organofosforados bajo dos condiciones: 10 mg/Kg y 20 mg/Kg, luego se agregó 10 mL de acetonitrilo como solvente de extracción, seguidamente se adicionó 1 g de cloruro sódico y 4

g sulfato magnésico para el paso de limpieza del extracto. La muestra fue agitada y centrifugada en una centrifugadora marca SIGMA modelo 204 por 5 minutos a 4000 rpm, seguidamente una alícuota de la fase líquida se sometió a un proceso de purificación empleando un cartucho que contiene una pequeña cantidad de un adsorbente conocido como amina primaria-secundaria (PSA por sus siglas en inglés), se agitó y se centrifugó. El sobrenadante se preconcentró por rota evaporación bajo las mismas condiciones seguidas para las muestras extraídas por micro ondas, reconstituyéndose en tolueno para su posterior análisis.

Las muestras extraídas fueron analizadas en un cromatógrafo de gases con detección masas, provisto de un automuestreador acoplado al puerto de inyección marca Agilent Technologies ® modelo 7890A, serie 7683B, con una columna capilar marca Agilent Technologies HP-SMS con dimensiones 30 m x 0,25 mm y 0,25 µm, temperatura de inyección 250 °C, volumen de inyección de 1 µL. El programa térmico utilizado para la separación de los diferentes pesticidas fue: temperatura inicial 80 °C por 2,5 minutos, luego a 20 °C/min hasta 175 °C por 1 min,

luego a 10 °C/min hasta 245 °C por 1 minuto, y finalmente a 20 °C/min hasta llegar a 295 °C por 5 minutos. La cuantificación se realizó con los métodos de calibración externa y estándar interno usando para este último phorate como estándar interno el cual es un insecticida organofosforado relativamente estable.

Resultados y discusión

Se evaluó los tiempos de retención (t_R) de los pesticidas estudiados aplicando el programa de temperatura descrito en la sección anterior, encontrándose que los compuestos eluyen a: Metilparatión $t_R = 13,99$ min; Heptacloro $t_R = 14,22$ min; Malatión $t_R = 14,65$ min y Aldrín $t_R = 14,89$ min. El compuesto Phorate se empleó como estándar interno, sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los métodos de calibración externa e interna.

Parámetros de calidad analítica instrumental

A partir de la curva de calibración externa se determinó para el Metil paration, heptacloro, malation, aldrin, el límite de detección (LD) (1,47; 1,41; 0,95 y 1,18 mg/L), el límite de cuantificación (LC) (4,90; 4,70; 1,56 y 3,94 mg/L), el límite de linealidad (LL) (152, 135, 103 y 123 mg/L), con ello se estableció el rango de trabajo lineal, que va desde el valor de LC hasta el LL, y finalmente se calculó el inverso de la sensibilidad analítica (1,20; 0,56; 1,63 y 0,18 mg/L) que es la mínima concentración diferenciable para cada compuesto estudiado.

Diseño factorial para la recuperación de los pesticidas por microondas

En la tabla 1, se muestra los resultados del porcentaje de recuperación para los pesticidas evaluados con extracción por microondas, para todos los experimentos realizados según el diseño factorial 2^3 con sus replicas. Para llevar a cabo la evaluación del diseño experimental se empleó el software estadístico Statgraphics® versión 16.2. La figura 1 muestra los diagramas de Pareto obtenidos

del análisis estadístico para la recuperación de los pesticidas estudiados. Para la recuperación de Metilparatión (figura 1-a) todas las variables son significativas y además tienen tendencia negativa, sin embargo el tiempo de extracción es quien exhibe un efecto más marcado sobre la recuperación, el signo negativo indica que la mayor respuesta se tiene a menores tiempos de extracción, es decir, 5 minutos. Se observa en la tabla 1 que para algunas condiciones experimentales no se recuperó Metilparatión, se infiere que este al ser un pesticida organofosforado tiene una baja persistencia y se degrada fácilmente cuando es expuesto a altos tiempos de extracción.

Las interacciones entre las variables tiempo (A), temperatura (B) y concentración (C) también son significativas, es decir que la respuesta del sistema se da en función de la combinación de estos tres factores, para la interacción AB y para la interacción AC la tendencia es positiva, mientras que para la interacción BC la tendencia es negativa.

Es posible establecer que valores deben tomar las variables que interactúan para que den lugar a una mayor respuesta, para ello se construye un diagrama de interacción como se muestra en la figura 2 (14).

Para el diagrama AC, los valores de los factores A y C que dan lugar a mayor recuperación son: A(-) = 5 minutos y C(-) = 50 mg/Kg. En el diagrama BC se obtiene mayor respuesta cuando las variables tiempo y concentración son de 60 °C y 50 mg/Kg, lo cual es muy similar en respuesta a la interacción B(-) y C(-), esto acentúa la importancia de que el factor C este en su nivel más bajo. Finalmente en el diagrama AB se obtiene mayor recuperación cuando A= 5 minutos y B= 40 °C. De los resultados del análisis factorial se visualiza que las condiciones óptimas de extracción son aquellas que involucran el menor tiempo de extracción y la menor concentración en estudio.

En la figura 1-b, se encuentra en el diagrama de Pareto que las variables más significativas para el Malatión son el tiempo de extracción y la interacción entre la temperatura y la concentración de pesticida añadido, observando que ambas tienen tendencia negativa. Para el tiempo de extracción se encuentra que a menores tiempos se obtiene una mayor respuesta, esto debido a que al aumentar el tiempo de

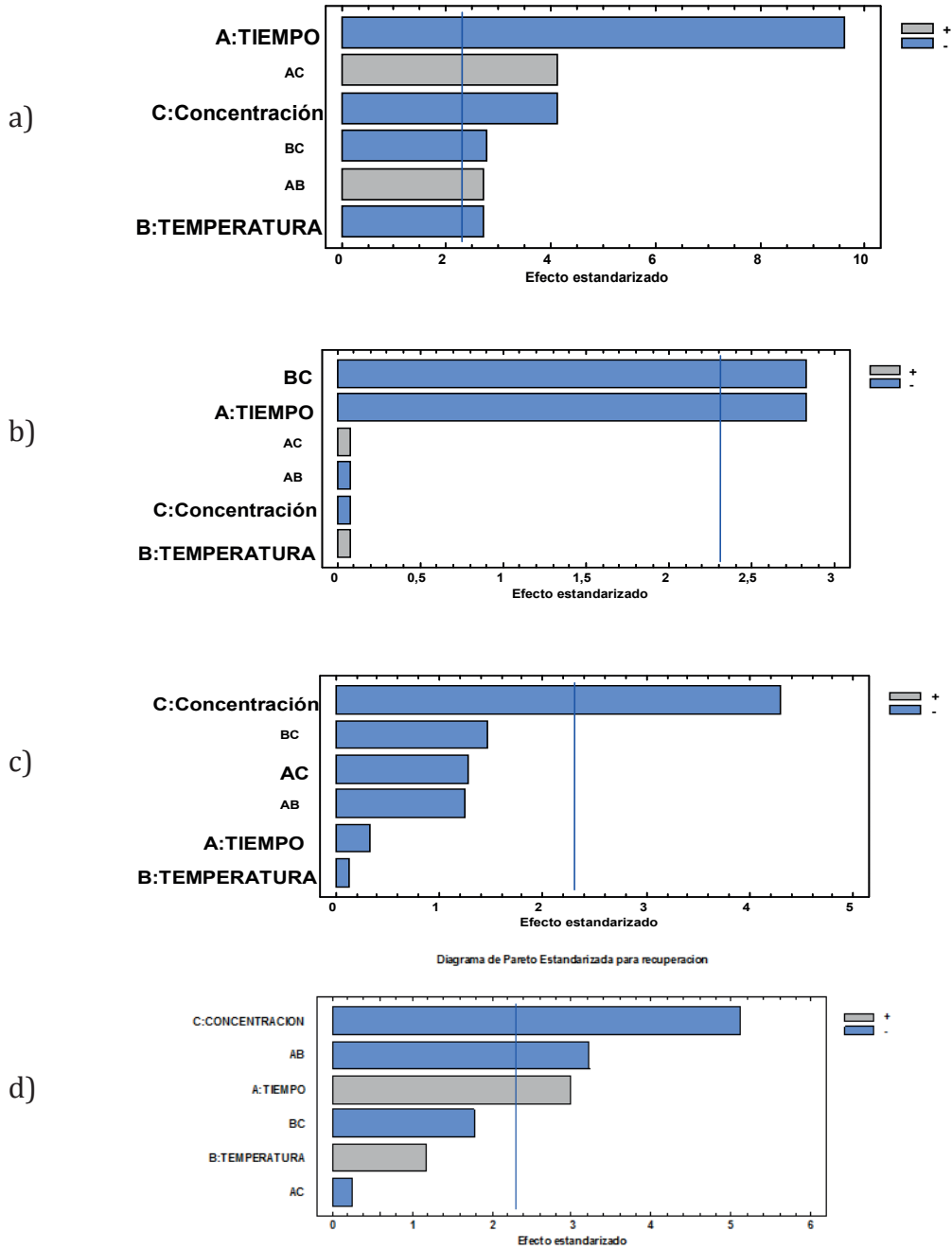


Figura 1. Diagrama de Pareto para la recuperación de los pesticidas a) Metil paration b) Malation C) Heptacloro d) Aldrín, con el método de extracción por microondas

extracción el pesticida Malatión se encuentra expuesto a una mayor cantidad de radiación microondas, degradándolo y afectando su recuperación tal como se observa en la tabla 1 y en similitud con el pesticida Metilparatión su par organofosforado. Por otro lado aunque las variables concentración y temperatura

no son significativas, la interacción de las mismas si lo son. De acuerdo al diagrama de interacción (Figura 2-b) se obtiene mayor recuperación cuando los niveles de los factores son B= 60 °C y C= 50 mg/Kg.

De los resultados del análisis factorial para el Malatión observamos que la condición óptima para

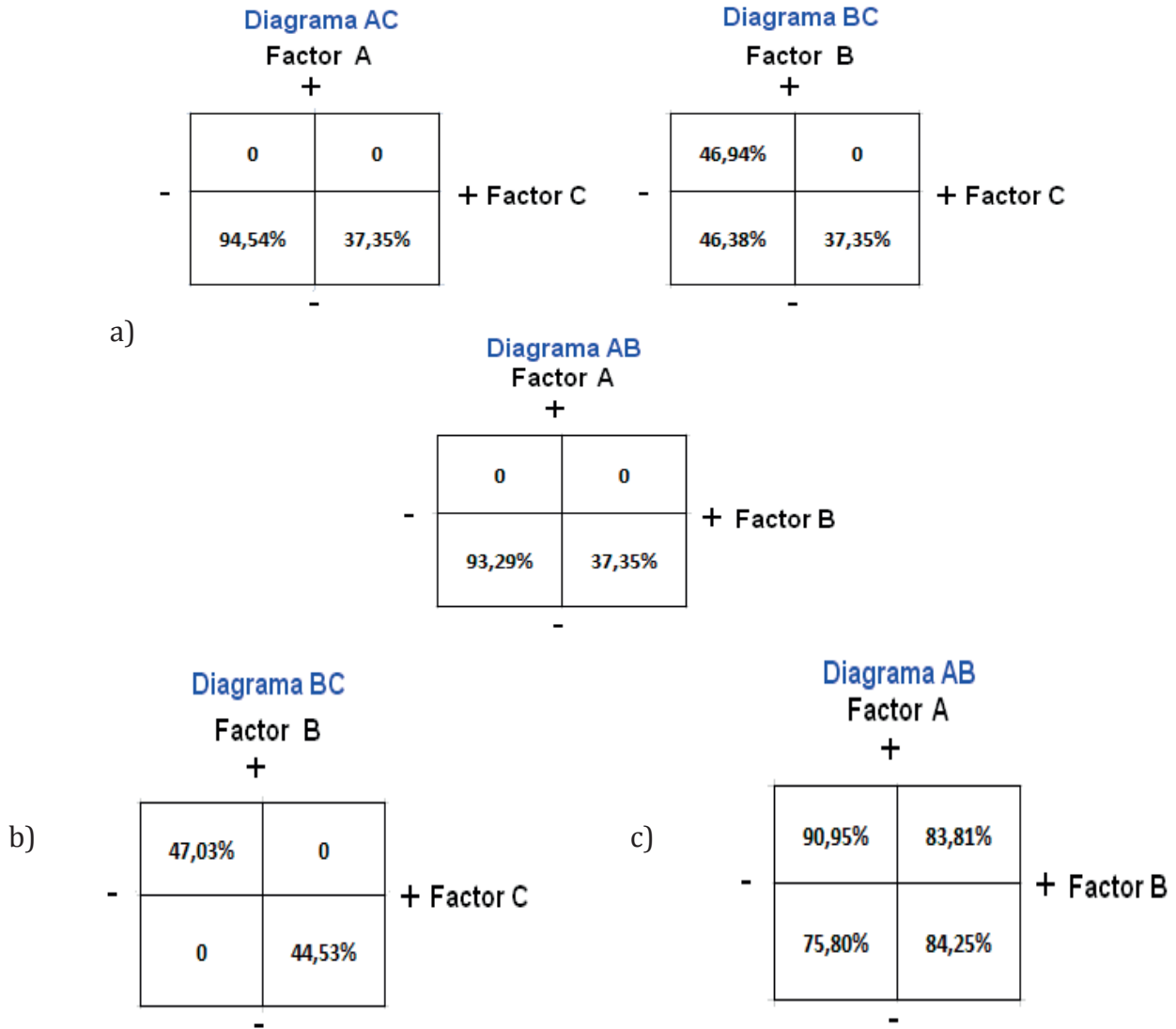


Figura 2. Diagramas de interacción para el pesticida a) Metilparatión b) Malatión c) Aldrín.

la extracción por microondas, es la que involucre el menor tiempo de extracción (5 minutos) y de acuerdo con el diagrama de interacción la mayor temperatura (60 °C) y la menor concentración de pesticida añadido (50 mg/Kg).

La figura 1-c y 1-d muestran los diagramas de paretos correspondientes a los resultados obtenidos para la recuperación de heptacloro y aldrin respectivamente. Para el Heptacloro se observa que la única variable significativa es la concentración de pesticida añadido y la misma tiene tendencia negativa por lo que se obtienen mejores recuperaciones cuando esta concentración es menor. Las demás variables experimentales no son significativas, por tanto sus efectos sobre la recuperación carecen de influencia. Se observa en la tabla 1 que a diferencia del Metilparatión se logró recuperación para todos los experimentos llevados a cabo bajo las distintas condiciones experimentales evaluadas.

En la figura 1-d el diagrama de pareto para el aldrin, muestra que las variables que tienen un mayor efecto sobre la recuperación son la concentración de pesticida agregado (50 mg/Kg), el

tiempo de extracción (10 minutos) y la interacción entre el tiempo y la temperatura de extracción, así mismo al igual que el Heptacloro, el Aldrín posee una persistencia mayor que sus pares organofosforados, por tanto soporta mayor tiempo de extracción. Por otra parte la combinación de los factores A y B son significativas, el diagrama de interacciones (figura 2-c) indica que se obtiene mayor recuperación en 10 minutos y 40 °C.

Evaluación del Método de extracción QuEChERS

En la tabla 2 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos para la extracción QuEChERS a dos concentraciones de pesticidas añadidos (10 mg/Kg y 20 mg/Kg). Como se observa los porcentajes de recuperación obtenidos superan el valor de 80% para ambas concentraciones, por lo que se confirma la confiabilidad del uso de este método para el análisis de los pesticidas evaluados.

Tabla 2
Porcentajes de recuperación para el método de extracción QuEChERS.

Pesticida	% Recuperación	% Recuperación
	10 mg/Kg	20 mg/Kg
Metilparatión	86,87	86,04
Heptacloro	84,42	94,48
Malatión	92,86	83,44
Aldrín	94,72	94,07

Análisis de las muestras obtenidas según la normativa codex alimentarius

Para el análisis de las muestras, se aplicó los protocolos de extracción óptimos obtenidos para microondas y QuEChERS en la muestra representativa colectada a través del muestreo codex alimentarius, con la intención de determinar la presencia o ausencia de los pesticidas estudiados. Para llevar a cabo esta determinación se comparó los picos cromatograficos tanto por los tiempos de retención como con los espectros de masas de cada pesticida según la librería del equipo NIST98.

Los cromatogramas generados para la muestra representativa (figura 3) no mostraron ningún señal correspondiente a los compuestos evaluados tanto para extracción microondas (figura 3-a) como por QuEChERS (figura 3-b) a los tiempos de retención en donde eluyen: Metilparatión $t_R = 13,99$ min; Heptacloro $t_R = 14,22$ min; Malatión $t_R = 14,65$ min y Aldrín $t_R = 14,89$ min. Igualmente esto fue corroborado por la búsqueda de los iones correspondiente a cada espectro de masas de cada compuesto, la ausencia tanto de los picos cromatográficos como de los espectros de masa indica que no hay residuos de los pesticidas evaluados en la muestra recolectada.

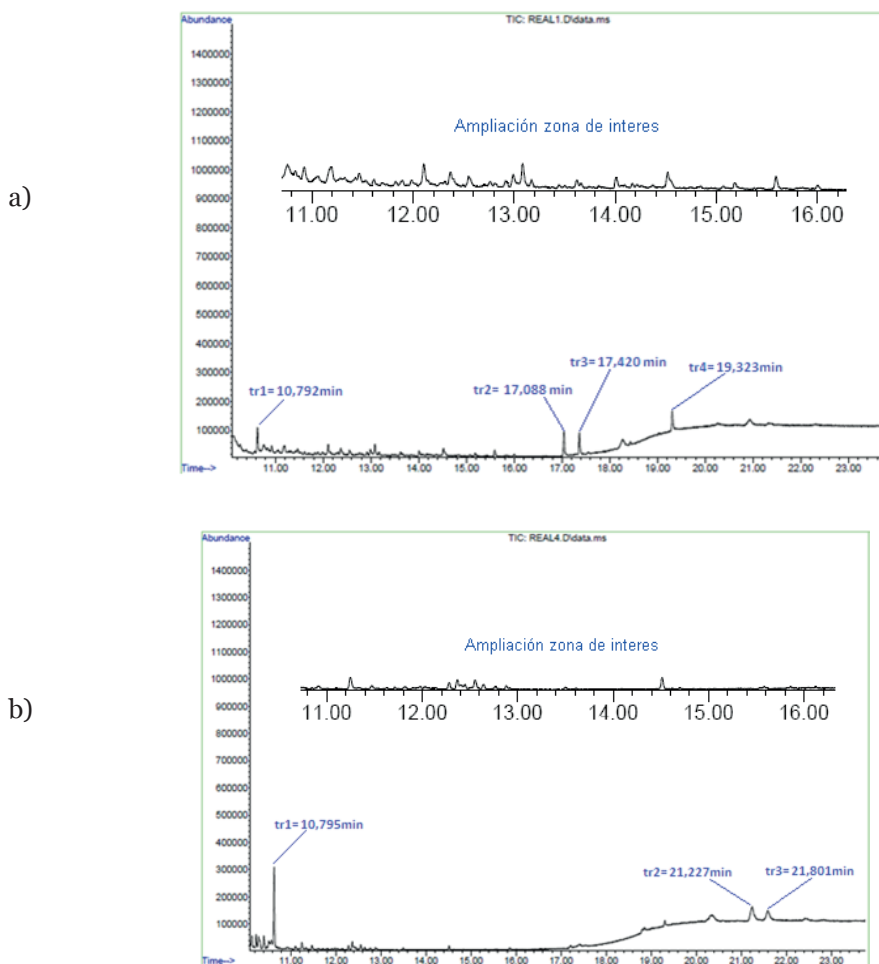


Figura 3: Cromatograma obtenido de una muestra de fresas por Extracción a) asistida por microondas b) QuEChERS

Ambos métodos de extracción no presentaron residuos de pesticidas para la muestra recolectada. Aunque compuestos de la familia de los organofosforados fueron empleados por los productores de los frutos, por lo que se supone que la poca persistencia de los mismos pudo causar su ausencia en el análisis de las muestras, mientras que en el caso los pesticidas organoclorados son empleados cada vez menos por los agricultores. Se destaca la presencia de un mayor número de picos cromatográficos en el caso de la extracción asistida por microondas con respecto al método QuEChERS, por lo que el paso de limpieza empleando la amina primaria secundaria en este último método, suprime

la presencia de algunos ácidos orgánicos, sustancias polares y otros compuestos que pudiesen interferir en el análisis, estos resultados son concordantes con los reportados por Oshita y colaboradores (15), quienes estudian el efecto del material absorbente usando el método QuEChERS en la determinación de pesticidas en fresas.

Conclusiones

La extracción asistida por microondas así como el método de extracción QuEChERS tienen parámetros estadísticos de precisión y exactitud

aceptable para la determinación de los pesticidas Metilparatión, Heptacloro, Malatión y Aldrín en muestras de fresas. El método QuEChERS es preciso, exacto y sencillo de aplicar obteniéndose extractos limpios y con recuperaciones mayores a 86%. Con microondas no se logro extraer simultáneamente los pesticidas organofosforados y organoclorados en todas las condiciones estudiadas por lo que requiere una mayor supervisión de la condiciones de extracción para obtener optimos resultados.

Agradecimiento.

Los autores agradecen a la Doctora Tamara Zoltan y al Licenciado Marcel Inojosa del Laboratorio de Fotoquímica del IVIC, por su apoyo en el análisis de las muestras.

Bibliografía

1. <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/pesticides/> Consultado Noviembre 2014.
2. GIL, M. Comunicación personal.
3. NERIN, C.; BATLLE, R.; CACHO, **J.J. *Chromatogr. A***, 795(1): 117-124. 1998.
4. FALQUIC., WANGI, URRUT J., MONTURY M. **J. Agric. Food Chem.** 4: 5092-5097. 2001.
5. TRTIC T., DORDEVIC J., DUJAKOVIC N., KUMRIC KVASILJEVIC T., **Anal. Bioanal Chem.** 397:2233–2243.2010.
6. ANASTASSIADES M., LEHOTAY S., STANJNBAHER D., SCHENCK F., **Journal of AOAC Int.** 86(2): 412-431. 2003.
7. WILKOWSKA A., BIZIUK M., **Food Chemistry**, 125 (3): 803–812.2011.
8. ALAMGIR M., FAKHRUDDINB A., MONIRUZZAMANA M., HUA S., KHORSHED M., **Food Control** 34 : 457-465.2013
9. GIAMPIERI F., TULIPANI S., ALVAREZ J., QUILES J., MEZZETTI B., BATTIN.M., **Nutrition**. 28: 9-12. 2012
10. SCHWIETERMAN M., COLQUHOUN T., JAWORSKI E., BARTOSHUK L., GILBERT J., TIEMAN D., ODABASI A., MOSKOWITZ., FOLTA K, **PLOS ONE**. 9 (2) :1-12 . 2014.
11. CRECENTE J., NUNES M., ROMERO MA., VÁZQUEZ M. **J. Food. Comp. Analysis**. 28 (1), 23–30. 2012.
12. <http://www.ine.gov.ve/documentos/Censo de población/vivienda/Aragua/consultado 02/05/12>.
13. <http://www.codexalimentarius.net/web/jmpr.jps>. consultado 10/05/2013.
14. BENZO Z., SALAS J., ARAUJO P., CAMARDIEL A., CARRION N, **Chemometrics and intelligent laboratory systems**,40,109-117,1998.
15. OSHITAD.,JARDINI, **Chromatographia**. 77:1291-1298. 2014.



UNIVERSIDAD
DEL ZULIA

CIENCIA

Vol. 23 N° 3, Julio-Septiembre 2015

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada
en Septiembre de 2015, por el **Fondo Editorial Serbiluz,**
Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela*