



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

**Determinación de pesticidas en vegetales
mediante cromatografía de gases-
espectrometría de masa/masa (GC-MS/MS)**

TESIS

Para obtener el título de Ingeniero en Alimentos

Presenta: Lucía Georgina Ramírez Milla

Directora: Dra. Norma Francenia Santos Sánchez

Huajuapán de León, Oaxaca, México. Noviembre de 2009

A Dios

*A mis padres,
porque todo lo que he logrado ha sido gracias a su constante amor, apoyo y confianza*

A toda mi familia y amigos

A Carlos y Libiana

A David

En especial a Paola, Diana, Ana y Fidel

*Agradezco a la Dra. Norma y al Dr. Raúl,
por su apoyo y confianza durante mis estudios universitarios y por guiarme durante el
desarrollo de la tesis. Por ser profesores e investigadores dedicados y comprometidos*

A la M.C. Leslie, Dra. Patricia y M. C. Vania por enriquecer el trabajo de tesis

Al I. A. Bernardo Rosales Méndez y al T. A. Manuel de Jesús Martínez Ramírez

*A May, Gina y Sarita,
por su ayuda y paciencia durante mi estancia en los laboratorios*

Este trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Ciencias Químico-Biológicas del Instituto de Agroindustrias de la Universidad Tecnológica de la Mixteca.

Parte de esta tesis se presentó en el 44° Congreso Mexicano de Química organizado por la Sociedad Química de México, A. C., en septiembre del 2009, obteniéndose mención honorífica en la categoría de cartel estudiantil.

RESUMEN

El uso intensivo de pesticidas en cultivos de vegetales propicia su persistencia en estos, y dependiendo de la concentración y toxicidad del pesticida puede llegar a perjudicar la salud de los consumidores. Por tal motivo, la Comunidad Europea (CE) y los gobiernos de Japón, Estados Unidos, entre otros, establecen límites máximos residuales (LMRs) para regular cada pesticida en un alimento en particular. El objetivo del presente trabajo consistió en determinar si la concentración de los pesticidas captan, carbofurán, endosulfán, malatión y metamidofos en calabacita, tomate verde y jitomate saladette sobrepasaba los LMRs establecidos por la CE. Cabe señalar que el captan se degrada rápidamente a tetrahidroftalimida (THFI), por lo tanto el compuesto estudiado fue este último. Para lograr lo anterior, se realizó una extracción de los pesticidas con acetato de etilo y una separación y cuantificación empleando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa/masa (GC-MS/MS). Los resultados del estudio, muestran que la concentración del metamidofos en tomate verde fue 15 veces el LMR, y en jitomate saladette A (JSA) y B (JSB) fue 15 y 42 veces, respectivamente. La concentración de THFI en JSA fue 258 veces el LMR; en calabacita, tomate verde, JSB y jitomate saladette orgánico (JSO) solamente se identificó. El malatión se cuantificó en calabacita, tomate verde, JSA y JSO (25.5, 1.3, 1.2 y 1.9 veces el LMR, respectivamente); mientras que en JSB estuvo en el LMR. La concentración del endosulfán en JSB fue 10.9 veces el LMR, y en calabacita y JSO sólo se identificó.

ABREVIATURAS

AM1	Analizador de masa 1
AM2	Analizador de masa 2
BPA	Buenas prácticas agrícolas
CE	Comunidad Europea
CI	Ionización química
CICLOPLAFEST	Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas
DGICURG	Dirección General de Investigación sobre la Contaminación Urbana y Regional
d. i.	Diámetro interno
DL₅₀	Dosis letal cincuenta
EI	Impacto electrónico
FAO	Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
GC	Cromatografía de gases
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
INE	Instituto Nacional de Ecología
LDD	Límite de detección
LDC	Límite de cuantificación
lit.	Literatura
LMR	Límite máximo residual
MS	Espectrometría de masa
MS/MS	Espectrometría de masa/masa o en cascada
(MS)ⁿ	Espectrometría de masa de multi-etapa
m/z	Masa/carga
NIOHS	<i>National Institute for Occupational Safety and Health</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppb	Partes por billón (ng/mL)
ppm	Partes por millón (µg/mL)
QqQ	Triple cuadrupolo
QuEChERS	Método de extracción rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
STA	Soluciones de trabajo de concentraciones: 1.0, 5.0 y 10 ppm con 2 ppm de cafeína
STB	Soluciones de trabajo de concentraciones: 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm con 0.5 ppm de cafeína
S/R	Señal a ruido
THFI	Tetrahidroftalimida, compuesto de degradación del captan

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Características de los pesticidas de importancia en esta investigación	11
Tabla 2. Técnicas de extracción y pesticidas identificados en análisis de pesticidas en frutas y vegetales	15
Tabla 3. Algunas columnas capilares empleadas en el análisis de residuos de pesticidas en alimentos	17
Tabla 4. Propiedades de detectores para GC	19
Tabla 5. Análisis de residuos de pesticidas en frutas, vegetales y cereales	27
Tabla 6. Características de los disolventes y reactivos empleados en el análisis de pesticidas	29
Tabla 7. Características de los pesticidas utilizados como estándares	29
Tabla 8. Origen de los vegetales estudiados	31
Tabla 9. Descripción de las muestras primarias y tamaño mínimo de las muestras de laboratorio	32
Tabla 10. Programa de temperatura empleado en la columna	35
Tabla 11. Estructuras de los pesticidas y estándar interno, iones precursores e iones producto	38
Tabla 12. Parámetros para el método de cuantificación para las soluciones de trabajo de 1.0 ppm y de 0.5 ppm	40
Tabla 13. Iones precursores e iones producto de los compuestos monitoreados	41
Tabla 14. Resultados para las soluciones de trabajo STA (1.0, 5.0 y 10 ppm con 2.0 ppm de cafeína)	41
Tabla 15. Resultados para las soluciones de trabajo STB (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm con 0.5 ppm de cafeína)	42
Tabla 16. Porcentajes de extracción con acetato de etilo de los vegetales estudiados	46
Tabla 17. Cantidad de muestra vegetal utilizada para el análisis	48
Tabla 18. Características del ión cuantificador y calificador de la cafeína en los vegetales estudiados	49

ÍNDICE DE TABLAS (CONTINUACIÓN)

	página
Tabla 19. Características de los pesticidas determinados en calabacita (CAL) con la curva de calibración STA	49
Tabla 20. Características de los pesticidas determinados en calabacita (CAL) con la curva de calibración STB	50
Tabla 21. Características de los pesticidas determinados en tomate verde (TV) con la curva de calibración STA	52
Tabla 22. Características de los pesticidas determinados en tomate verde (TV) con la curva de calibración STB	53
Tabla 23. Características de los pesticidas determinados en jitomate saladette A y B (JSA y JSB) con la curva de calibración STA	55
Tabla 24. Características de los pesticidas determinados en jitomate saladette A, B y orgánico (JSA, JSB y JSO) con la curva de calibración STB	57
Tabla 25. Porcentajes del coeficiente de variación obtenidos de la extracción y del análisis	63
Tabla 26. LDDs y LDCs obtenidos para las curvas de calibración STA y STB	64

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Vegetales. a. calabacita (<i>Cucurbita pepo</i>), b. tomate verde (<i>Physalis ixocarpa</i>) y c. jitomate saladette (<i>Lycopersicum esculentum</i>)	1
Figura 2. Equipo de GC 3800 y MS 1200L Varian	4
Figura 3. Inserto empacado con Carbofrit®	18
Figura 4. Esquema de las características principales de un espectrómetro de masa	21
Figura 5. Descripción del funcionamiento de un sistema de MS/MS	22
Figura 6. a. Trampa de iones. b. Triple cuadrupolo (QQQ)	23
Figura 7. Espectro hipotético de masa multi-etapa (MS ³)	25
Figura 8. Vegetales molidos. a. calabacita (<i>Cucurbita pepo</i>), b. tomate verde (<i>Physalis ixocarpa</i>) y c. jitomate saladette (<i>Lycopersicum esculentum</i>)	33
Figura 9. Cromatograma de la solución de trabajo 40 ppm de cada compuesto	36
Figura 10. Degradación del captan a tetrahidroftalimida (THFI)	47
Figura 11. Pesticidas identificados y cuantificados en calabacita (CAL) comparados con LMRs*	51
Figura 12. Pesticidas identificados y cuantificados en tomate verde (TV) comparados con LMRs*	54
Figura 13. Pesticidas identificados y cuantificados en jitomate saladette A (JSA), jitomate saladette B (JSB) y orgánico y (JSO) y comparación con LMRs*	58
Figura 14. Cromatograma de la solución de trabajo de 1.0 ppm de cada pesticida y 2.0 ppm de estándar interno (cafeína), mostrando la relación S/R	65
Figura 15. Cromatograma de la solución de trabajo de 0.5 ppm de cada pesticida y 0.5 ppm de estándar interno (cafeína), mostrando la relación S/R	65

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	iv
ABREVIATURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hipótesis	4
1.2. Objetivo general	4
1.3. Objetivos específicos	5
2. ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS	6
2.1. Generalidades sobre los pesticidas	7
2.2. Uso y control de pesticidas	9
2.3. Métodos empleados en la determinación de pesticidas	12
2.3.1. Métodos de extracción de pesticidas	12
2.3.2. Extracción con disolventes orgánicos	13
2.3.3. Métodos de separación, identificación y cuantificación de pesticidas	15
2.3.3.1. Técnicas de separación: Cromatografía	16
2.3.3.2. Técnicas de identificación: Detectores	19
2.4. Estudios relacionados	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Reactivos y disolventes	28
3.2. Equipo, material en general e instrumentación	30
3.3. Recolección y almacenamiento	31
3.4. Extracción de residuos de pesticidas	33
3.5. Condiciones en el equipo de GC-MS/MS	34

ÍNDICE GENERAL (CONTINUACIÓN)

	Página
3.6. Métodos de identificación y cuantificación	39
3.7. Criterio de calidad interna	43
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	45
4.1. Extracción sólido-líquido de pesticidas en los vegetales estudiados	45
4.2. Análisis del estándar interno y de pesticidas en los vegetales estudiados	46
4.2.1. Análisis del estándar interno (cafeína)	48
4.2.2. Análisis de pesticidas en calabacita <i>Cucurbita pepo</i> (CAL)	49
4.2.3. Análisis de pesticidas en tomate verde <i>Physalis ixocarpa</i> (TV)	52
4.2.4. Análisis de pesticidas en jitomate saladette (<i>Lycopersicum esculentum</i>) A, B y orgánico (JSA, JSB y JSO)	54
4.2.5. Análisis comparativo de pesticidas en los vegetales estudiados	59
4.3. Criterios de calidad interna	63
5. CONCLUSIONES	67
6. PERSPECTIVAS	69
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
8. OTRAS FUENTES CONSULTADAS	74
9. APÉNDICES	75
Apéndice 1. Cromatogramas y espectros de masa/masa de los pesticidas y estándar interno de las soluciones de trabajo	75
Apéndice 2. Cromatogramas y espectros de masa/masa de los pesticidas de los vegetales estudiados	86

ÍNDICE GENERAL (CONTINUACIÓN)

	Página
10. ANEXOS	91
Anexo 1. Propiedades de disolventes empleados comúnmente en el análisis de residuos de pesticidas a 20-25°C	91
Anexo 2. Columnas capilares y empacadas	92

1. INTRODUCCIÓN

La agricultura se beneficia de la aplicación extensiva de pesticidas debido a que disminuye la pérdida de cultivos y aumenta la producción. Al igual que en la mayor parte del país, la agricultura en la región Mixteca Oaxaqueña y Poblana involucra el uso de diversos pesticidas para el control de plagas, enfermedades y todo tipo de amenaza en los cultivos de vegetales, cereales y frutas.

La población de la región Mixteca de Oaxaca, demanda y consume una gran variedad de vegetales cultivados a cielo abierto o en invernaderos en donde se emplean diferentes pesticidas. El censo agrícola realizado por SAGARPA en 2005 determinó que algunos de los vegetales de mayor consumo en la región mencionada son: calabacita (*Cucurbita pepo*), tomate verde (*Physalis ixocarpa*) y jitomate saladette (*Lycopersicon esculentum*) (Anuario Estadístico de la Producción Agrícola, SAGARPA, 2005). Para la realización de este estudio, la calabacita y el tomate verde se adquirió en el mercado Zaragoza de la ciudad de Huajuapán de León, Oaxaca, en los meses de noviembre y diciembre de 2008 y enero de 2009. Además, las muestras de jitomate saladette se adquirieron con productores de la región y en un mercado orgánico de la ciudad de Oaxaca en noviembre de 2008, Figura 1.

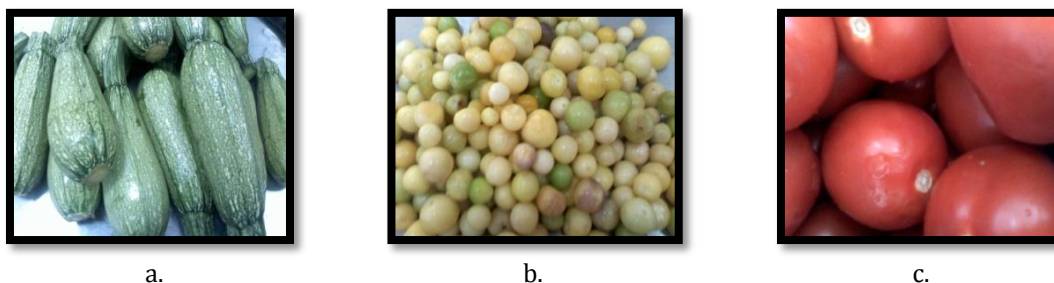


Figura 1. Vegetales. a. calabacita (*Cucurbita pepo*), b. tomate verde (*Physalis ixocarpa*) y c. jitomate saladette (*Lycopersicon esculentum*)

Los pesticidas empleados indiscriminadamente, dependiendo de la toxicidad, el tiempo y el tipo de exposición, representan un riesgo potencial a los consumidores y al ambiente, incluyendo los suelos y el agua. Por lo que la Comunidad Europea (CE), la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y algunos gobiernos han convertido al monitoreo y control de los pesticidas en actividades prioritarias para determinar la calidad y seguridad de los alimentos y han establecido límites máximos residuales (LMRs).

En países industrializados (Canadá, Estados Unidos de América, España, Japón, entre otros) el monitoreo de residuos de pesticidas en alimentos se realiza continuamente. Aunque el control de los pesticidas es más eficaz en estos países, se han reportado alimentos con niveles residuales de pesticidas por encima de los LMRs (Columé, A. *et al.*, 2001; Poulsen, M. E.; Andersen, J. H., 2003). Se han desarrollado y validado diversas técnicas y metodologías, y se emplean en análisis de rutina, los resultados de los análisis realizados a diferentes alimentos se publican periódicamente (Poulsen, M. E.; Andersen, J. H., 2003; Araoud, M. *et al.*, 2007; Mezcua, M. *et al.*, 2009).

Para sustentar los resultados de los análisis de residuos de pesticidas realizados en alimentos, es primordial emplear técnicas y metodologías sistemáticas que permitan la extracción, separación, identificación y cuantificación. Además, es importante validar los métodos considerando varios parámetros de calidad, entre ellos, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), límites de detección (LDD) y límites de cuantificación (LDC), también puede considerarse el uso de adición estándar o emplear un estándar interno (Fernández-Moreno, J. L. *et al.*, 2008).

Cabe señalar que la mayor parte de los estudios publicados e información descrita en la literatura sobre el contenido de pesticidas en alimentos de origen mexicano se realiza por los países antes mencionados (Frank, R. *et al.*, 1985). Los resultados de dichos análisis muestran que la mayoría o totalidad de los alimentos mexicanos estudiados exceden los LMRs establecidos por la CE.

En México, los trabajos de investigación sobre residuos de pesticidas en frutas y vegetales son escasos (Aldana-Madrid, M. L. *et al.*, 2008; Hernández-Hernández, C. N. A. *et al.*, 2007;

Pérez, M. A. *et al.*, 2009; Waliszewski, S. M. *et al.*, 2004 y 2008). Además, la mayoría de las publicaciones e información sobre los niveles residuales de pesticidas en alimentos consumidos en México son de origen animal y sus derivados (García de Llasera, M. P.; Reyes-Reyes, M. L., 2009; Jimenez-Castro, C. *et al.*, 1995; Pardío, V. T. *et al.*, 2003; Salas, J. H. *et al.*, 2003; Uresti-Martín, R. M. *et al.*, 2008; Waliszewski, S. M. *et al.*, 1997, 2003 y 2004). Por lo anterior, es importante determinar si las concentraciones de pesticidas se encuentran o sobrepasan los LMRs en algunos de los vegetales cultivados en la región Mixteca Oaxaqueña y Poblana, y establecer si los vegetales son seguros para la salud de los consumidores.

Para realizar la extracción de residuos de pesticidas de alimentos, se han implementado técnicas, tales como: extracción sólido-líquido o líquido-líquido, QuEChERS (rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro por sus siglas en inglés), extracción con fluidos supercríticos, extracción con líquidos presurizados, extracción asistida con microondas, extracción en fase sólida y micro-extracción en fase sólida. Cualquier técnica de extracción a emplear en el análisis de residuos de pesticidas en alimentos debe maximizar la recuperación de analitos y minimizar las interferencias (Lambropoulou, D. A.; Albanis, T. A., 2007).

Además, las metodologías analíticas empleadas para realizar la separación, identificación y cuantificación, miden residuos a niveles de concentración de ppm, y proveen evidencia confiable para confirmar la identidad y la magnitud de los residuos detectados. Los métodos analíticos descritos en la literatura incluyen generalmente cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), acopladas a un detector selectivo o universal. Los detectores empleados son: de conductividad térmica, de ionización de llama, de captura de electrones, de fotometría de llama y de nitrógeno-fósforo, detector Hall, detector infrarrojo de transformada de Fourier y espectrómetro de masa (Lambropoulou, D. A.; Albanis, T. A., 2007; Rubinson, K. A.; Rubinson, J. F., 2001).

Es esencial emplear las técnicas y metodologías que permitan obtener resultados reproducibles, confiables y puedan emplearse en análisis de rutina, esto implica utilizar técnicas de extracción adecuadas y establecer las condiciones apropiadas de operación de los equipos disponibles.

La técnica de extracción de residuos de pesticidas utilizada en esta investigación fue la extracción sólido-líquido empleando acetato de etilo como disolvente. Esta técnica fue usada debido a su simplicidad, intervalo de aplicación amplio, rapidez y recuperaciones altas de compuestos de polaridad diferente. La extracción sólido-líquido se ha empleado en alimentos líquidos, vegetales y frutas (Araoud, M. *et al.*, 2007; Lambropoulou, D. A. *et al.*, 2007; Garrido-Frenich, A. *et al.*, 2004 y 2005).

Para realizar la separación, identificación y cuantificación de los residuos de pesticidas en el extracto, se empleó la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa/masa o en cascada (GC-MS/MS), Figura 2. Las ventajas principales de esta metodología se centran en su selectividad y sensibilidad a concentraciones traza (ppm y ppb) de pesticidas en muestras complejas, además es sencilla, tiene una alta confiabilidad y es rápida (Kotretsou, S. I.; Koutsodimou, A., 2006; Walorczyk, S., 2007; Fernández-Moreno, J. L. *et al.*, 2008).



Figura 2. Equipo de GC 3800 y MS 1200L Varian

1.1. Hipótesis

La extracción sólido-líquido y la GC-MS/MS-QqQ permiten la separación, identificación y cuantificación inequívoca de los pesticidas captan, carbofurán, endosulfán, malatión y metamidofos, en ppm presentes en calabacita, tomate verde y jitomate saladette.

1.2. Objetivo general

Determinar en calabacita, tomate verde y jitomate saladette residuos de captan, carbofurán, endosulfán, malatión y metamidofos, empleando extracción sólido-líquido

seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa/masa (GC-MS/MS-QqQ), y comparar la concentración de residuos de éstos pesticidas con los LMRs establecidos por la CE.

1.3. Objetivos específicos

- Realizar la extracción sólido-líquido de los pesticidas en vegetales empleando acetato de etilo como disolvente.
- Establecer las condiciones de operación en el equipo de GC-MS/MS.
- Crear los métodos de identificación en el equipo de GC-MS/MS para cada pesticida considerando los tiempos de retención y los iones producto calificadores.
- Crear los métodos de cuantificación en el equipo de GC-MS/MS para cada pesticida considerando los iones producto cuantificadores y la relación de áreas entre éste y el estándar interno.
- Comparar las concentraciones de los pesticidas detectados en los vegetales con los límites máximos residuales (LMRs) establecidos por la CE, y registrar aquellos que rebasan dichos LMRs.
- Calcular coeficientes de variación obtenidos en la extracción y en el análisis en el equipo de GC-MS/MS, además calcular el límite de detección (LDD) y el límite de cuantificación (LDC) para cada pesticida estudiado.

2. ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS

El uso intensivo de pesticidas en cultivos de vegetales propicia su persistencia en estos, y dependiendo de la concentración y toxicidad del pesticida puede llegar a perjudicar la salud de los consumidores. Por tal motivo, la Comunidad Europea (CE) y los gobiernos de Canadá, Estados Unidos de América, Japón, entre otros, establecen límites máximos residuales (LMRs) para regular cada pesticida en un alimento en particular.

Realizar el análisis de pesticidas en concentraciones de ppm ó ppb en alimentos es una tarea delicada, debido a la composición de la matriz y a la variedad de pesticidas que existen.

Recientemente, la tendencia en el análisis de pesticidas es el desarrollo de métodos multi-residuos que detectan un gran número de compuestos en un solo proceso. En general dicho análisis incluye extracción, separación, identificación y cuantificación.

Para efectuar la extracción efectiva de los residuos de pesticidas se han desarrollado varias técnicas. Una vez obtenido el extracto es necesario realizar el análisis instrumental, que consiste en la separación, identificación y cuantificación de los pesticidas generalmente mediante cromatografía de gases (GC) acoplada a un detector selectivo.

Este capítulo incluye información sobre los pesticidas de interés en esta investigación y sus consecuencias en la salud, así como la situación de los pesticidas a nivel mundial. Se enumeran técnicas de extracción y equipos para análisis instrumentales más usados, principalmente en el análisis de residuos de pesticidas en alimentos, así como los empleados en este trabajo.

2.1. Generalidades sobre los pesticidas

Debido a las necesidades alimenticias que requiere la población, los productores necesitan asegurar una determinada producción de alimentos y, si es posible, aumentar los rendimientos.

El uso de pesticidas es una herramienta que permite asegurar y alcanzar los objetivos de producción de vegetales. Los pesticidas son definidos por la comisión del codex alimentarius en conjunto con la FAO/OMS (1997) como: toda sustancia que se emplea para combatir las plagas agrícolas durante la producción, comercialización o elaboración de los alimentos o a toda sustancia que pueda administrarse por aplicación interna a los animales para destruir insectos o arácnidos, incluyéndose herbicidas, fungicidas, rodenticidas, reguladores del crecimiento vegetal; no incluyéndose los abonos. Los pesticidas no son necesariamente venenos, pero pueden ser tóxicos (Alarcón-Rodríguez, R., 2004).

Aunque los pesticidas son necesarios, los residuos de éstos en los vegetales y en el ambiente; provocan efectos negativos en la salud que dependen de la proporción con la que se absorbe el pesticida. Algunos efectos que se presentan son: toxicidad neurológica aguda, daño neurológico crónico, disfunción de los sistemas inmune, reproductivo y endocrino o cáncer (Dömötörova, M.; Matisová, E., 2008). Por lo que es necesario que su monitoreo y control se convierta en una actividad prioritaria para determinar la calidad y seguridad de los alimentos.

A continuación se mencionan características generales de los pesticidas (según su grupo químico) de mayor interés en esta investigación.

- **Organoclorados.** Son de bajo costo y amplio espectro, su persistencia va desde moderada a muy persistentes, y sus residuos se encuentran en el ambiente y en los seres vivos. Son liposolubles, solubles en compuestos orgánicos de baja polaridad. Se acumulan en el tejido graso y se metabolizan lentamente. Son estables química y bioquímicamente. Se caracterizan por tener una estructura cíclica y átomos de cloro; dependiendo de dicha estructura, los pesticidas organoclorados se clasifican en tres grupos principales.

- a. Derivados halogenados de hidrocarburos alicíclicos, como el lindano.
- b. Derivados halogenados de hidrocarburos aromáticos, como el DDT.
- c. Derivados halogenados de hidrocarburos ciclodiénicos, como el aldrín y el endosulfán.

El lindano, los ciclodiénicos (aldrín, dieldrín, endrín, clordano) y el endosulfán son absorbidos a través de la piel. La acción tóxica principal de estos pesticidas se dirige al sistema nervioso, en donde estos compuestos inducen a un estado de sobre-excitación en el cerebro.

▪ **Organofosforados.** Son generalmente ésteres de ácido fosfórico sustituidos. Se descomponen con mayor facilidad y son menos persistentes en el ambiente que los organoclorados, pero más peligrosos debido a que tienen un grado alto de toxicidad. Son biodegradables y no se acumulan en el organismo. Se han convertido en los insecticidas de mayor uso (Albert, L. A., 1990).

Los sustituyentes tienen gran influencia en las propiedades fisicoquímicas del compuesto y se relacionan además con la capacidad de penetración, distribución, activación y degradación del pesticida, con su sitio de ataque, potencia y selectividad.

Algunos ejemplos son: clorfenvinfos, demetión, diclorvos, diazinón, etil paratión, etión, fentión, fosfolán, malatión, metamidofos, metilazinfos, monocrotofos, tricorfón.

La intoxicación por organofosforados provoca que los impulsos nerviosos no se transmitan normalmente. Los compuestos organofosforados varían de moderada a extremadamente tóxicos. Generalmente la vía de penetración de estos compuestos al organismo humano es la piel, aunque también puede ocurrir intoxicación aguda al ingerirlos o inhalarlos (Albert, L. A., 1990). Algunos organofosforados que se degradan lentamente, pueden almacenarse temporalmente de manera significativa en el tejido graso.

▪ **Carbamatos.** Todos los carbamatos comparten la misma estructura base, son ésteres N-sustituídos del ácido carbámico. Las diferencias en la longitud de sus cadenas laterales determinan su toxicidad. Generalmente se consideran menos tóxicos que los compuestos organofosforados. Son usados principalmente como insecticidas de amplio espectro. Los tiocarbamatos y ditiocarbamatos son generalmente insecticidas débiles y también son usados frecuentemente como herbicidas o fungicidas.

La mayoría de los carbamatos son fácil y rápidamente absorbidos a través de la piel, pulmones, tracto gastrointestinal y mucosas. Se ha reportado que la exposición crónica causa debilidad, anorexia, pérdida de la memoria y temblores musculares.

El carbofurán es considerado un insecticida con toxicidad alta ($DL_{50} = 50 \mu\text{g}/\text{kg}$) (Dart, R. C. *et al.*, 2003).

▪ **Dicarboxiimidias.** Dentro de este grupo se agrupan las sulfonimidias y las imidas N-cíclicas, aunque son compuestos diferentes estructuralmente se clasifican como fungicidas dicarboxiimidias. Estos heterociclos sufren degradación hidrolítica y/o fotolítica en suelos, plantas y animales.

El captan, folpet y captafol son sulfoniimidias y son usados principalmente para el control de mohos en frutas y vegetales. El captan se absorbe por el tracto gastrointestinal y se metaboliza rápidamente (Roberts, T.; Hutson, D., 1999).

2.2. Uso y control de pesticidas

En México, la Dirección General de Investigación sobre la Contaminación Urbana y Regional (DGICURG), que pertenece al Instituto Nacional de Ecología (INE), difunde información sobre el manejo adecuado de las sustancias químicas, participa en la ejecución de estrategias de monitoreo y evaluación ambiental, desarrolla inventarios sobre plaguicidas y sustancias tóxicas y genera estrategias de investigación sobre comunicación de riesgos. Esta dirección, mediante la Investigación sobre Sustancias

Químicas y Riesgos Ecotoxicológicos y el Sistema de Consulta de Plaguicidas, enlista los plaguicidas permitidos, prohibidos y restringidos¹.

Por otra parte, la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) apoya sus acciones en la Ley General de Salud y en la Ley Federal de Sanidad Vegetal para el manejo adecuado de plaguicidas y fertilizantes en la agricultura y medidas fitosanitarias. En 2004, la CICOPLAFEST actualizó el Catálogo Oficial de Plaguicidas que originalmente se elaboró en 1998. Los únicos plaguicidas cuya importación, comercialización y uso están permitidos en México, son los que han sido registrados por la CICOPLAFEST.

El catálogo incluye hojas de datos de los pesticidas autorizados en México. Establece la toxicidad de los pesticidas calculando la dosis letal cincuenta (DL_{50}), que es definida como la cantidad mínima de una sustancia que es capaz de matar al 50% de una población de animales de prueba. Los resultados de DL_{50} obtenidos para un determinado pesticida, se extrapolan a los humanos y sirven de base para los sistemas de clasificación de la toxicidad. El catálogo no incluye límites máximos residuales (LMRs).

Es importante señalar, que aún cuando los pesticidas hayan sido utilizados correctamente, es probable que la concentración de residuos en los alimentos se incremente debido al uso de agua de riego y tierras de cultivo contaminadas, o aumentar durante la comercialización al estar en contacto con alimentos con residuos en concentraciones altas.

El uso de pesticidas es común en el cultivo de vegetales en México. En la Tabla 1, se muestran algunos de los pesticidas más empleados en los cultivos de los vegetales de estudio².

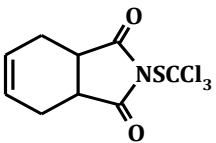
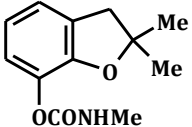
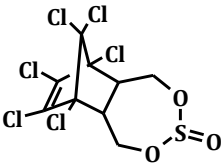
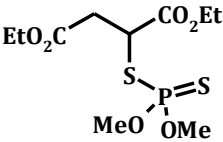
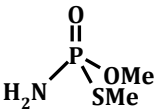
Con respecto al resto del mundo, la Comunidad Europea (CE), Codex Alimentarius o gobiernos internacionales como los de Australia, Canadá, Estados Unidos de América y Japón, han establecido límites máximos residuales (LMRs). Los LMRs son definidos como:

¹ Listas de plaguicidas permitidos, prohibidos y restringidos: <http://www.ine.gob.mx/dgicurg/plaguicidas/>

² Datos proporcionados por la Brigada de Promoción del Desarrollo de la Universidad Tecnológica de la Mixteca

la máxima concentración de residuo de pesticida, expresado como miligramos de residuo por kilogramo de producto (mg/kg), probable a ocurrir en los productos alimenticios y alimentos para animales después del uso de pesticidas de acuerdo a las buenas prácticas agrícolas (BPA) (Dömötörova, M.; Matisová, E., 2008).

Tabla 1. Características de los pesticidas de importancia en esta investigación

<i>Nombre común</i>	<i>Estructura</i>	<i>Acción específica</i>	<i>Grupo químico</i>	<i>Persistencia^a</i>	<i>LMRs (mg/kg)^b</i>
Captan		Fungicida	Dicarboxiimida	No persistente (hasta 2 semanas)	calabacita: 0.02 tomate verde, jitomate saladette: 2.0
Carbofurán		Insecticida	Carbamato	No persistente (4-8 semanas)	calabacita, tomate verde, jitomate saladette: 0.02
Endosulfán		Insecticida	Organoclorado (ciclodieno)	Moderadamente persistente (5-8 meses)	calabacita: 0.05 tomate verde, jitomate saladette: 0.5
Malatión		Insecticida	Organofosforado	No persistente (hasta 1 semana)	calabacita: 0.02 tomate verde, jitomate saladette: 0.5
Metamidofos		Acaricida Insecticida	Organofosforado	No persistente (6-12 días)	calabacita, tomate verde, jitomate saladette: 0.01

a. www.semarnat.gob.mx/gestionambiental/Materiales%20y%20Actividades%20Riesgosas/plafest/clasificaciones.pdf.

b. Expresado en masa fresca. Directiva 91/414/ECC.

2.3. Métodos empleados en el análisis de residuos de pesticidas en alimentos

El análisis de pesticidas en alimentos está sujeto a la complejidad de la matriz y a las concentraciones bajas a las cuales estos compuestos están presentes. Por lo tanto, la extracción de los residuos constituye el paso más crítico. Este paso consiste en la extracción de los analitos desde su matriz con un disolvente apropiado, opcionalmente se puede realizar la remoción de sustancias que podrían causar interferencias mediante varios pasos de limpieza y finalmente, la reducción del volumen del disolvente en el extracto antes del análisis instrumental (Patnaik, P., 2004).

Después de la extracción, el análisis se continúa comúnmente con la separación de los analitos empleando cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), acopladas a uno o varios detectores selectivos para la determinación, identificación y cuantificación de residuos de pesticidas (Pang, G. F. *et al.*, 2006).

En las siguientes secciones se describen los procesos de extracción y los métodos de separación e identificación de residuos de pesticidas en diversas matrices alimentarias.

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

Se han propuesto muchas opciones para el pre-tratamiento y extracción de residuos de pesticidas en alimentos. En la mayoría de estas, el proceso de extracción usualmente involucra la homogenización de la muestra con un disolvente orgánico, solo o en mezcla, usando un homogenizador, mezclador o sonicador, conocida como extracción líquido-líquido o extracción sólido-líquido, dependiendo de la naturaleza de la muestra.

A continuación se describe la técnica de extracción usada en este trabajo de investigación. Ésta fue la extracción sólido-líquido con acetato de etilo como disolvente, debido a que es la más empleada en el análisis multi-residuos de pesticidas en vegetales, además esta técnica es relativamente sencilla, rápida y se recupera un porcentaje alto de los residuos de pesticidas presentes en los vegetales (Garrido-Frenich, A. *et al.*, 2004 y 2005; Martínez-Vidal, J. L. *et al.*, 2002 y 2006).

2.3.2. Extracción con disolventes orgánicos. Es la técnica más usada, principalmente por la facilidad de uso y la amplitud de aplicación. El proceso de extracción varía ligeramente dependiendo si la muestra es líquida o sólida. Las muestras sólidas se homogenizan antes de la extracción mediante la molienda, mezclado, agitado, aplastado, macerado, presurizado y pulverizado. Después, una porción se licúa o agita con un disolvente orgánico o con una mezcla de diferentes disolventes orgánicos. Después de agitar correctamente, puede centrifugarse y la fase orgánica se evapora para obtener un volumen pequeño, o a la fase orgánica se le agrega sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) para eliminar el agua presente en la muestra. En el primer caso, el residuo se re-disuelve en una mezcla de disolventes orgánicos y, posteriormente se inyecta en el sistema de GC. En el segundo caso, el Na_2SO_4 se separa, mediante la centrifugación o filtración, y el sobrenadante se concentra o inyecta directamente en el cromatógrafo de gases.

Generalmente es necesario evaporar o concentrar el extracto para disminuir el volumen del disolvente. La concentración ayuda a reducir los límites de detección.

Ya que las muestras alimenticias son complejas, suelen ser necesarios pasos de limpieza, para eliminar pigmentos, proteínas, azúcares y ácidos grasos que interfieren con la detección de pesticidas a niveles de trazas y aunque éstos consumen tiempo, se incluyen para evitar contaminación del sistema de GC, de esta manera se reduce la cantidad de interferencias que provocan pérdida de resolución, aunque aumenta el costo del análisis (Columé, A. *et al.*, 2001).

Para realizar la extracción existe una gran variedad de disolventes orgánicos disponibles que permiten una homogenización fácil durante el licuado o la agitación, Anexo 1.

La polaridad es el factor más importante en la elección del disolvente para una aplicación en particular. En métodos multi-residuos de pesticidas, la acetona, el acetonitrilo y el acetato de etilo han mostrado proporcionar altas recuperaciones para un amplio intervalo de pesticidas, cada uno con algunas ventajas sobre otros disolventes (Lambropoulou, D. A.; Albanis, T. A., 2007).

La habilidad para remover agua del extracto inicial es esencial para obtener un alto grado de selectividad en muestras con humedad alta, como los alimentos. La co-extracción de proteínas, azúcares y otros compuestos polares suele incrementar junto con la cantidad de agua en el extracto; así, los disolventes que eviten el agua dan una mayor selectividad. El acetato de etilo y acetonitrilo son mejores que la acetona porque el agua se elimina más fácilmente usando una sal.

El acetonitrilo es un disolvente polar, miscible en agua pero con suficientes propiedades dispersivas (hidrofóbicas) para extraer eficientemente tanto residuos de pesticidas polares como no polares desde alimentos no grasos. Los extractos de acetonitrilo contienen usualmente co-extraídos (pigmentos principalmente).

Se han descrito métodos basados en el uso de acetato de etilo como disolvente y se han validado y usado para la determinación de diferentes grupos de pesticidas en frutas y vegetales (Krynitsky, A. J.; Lehotay, S. J., 2003). Además este disolvente provee buenas recuperaciones para un número amplio de pesticidas con propiedades diferentes (Garrido-Frenich, A. *et al.*, 2004 y 2005; Martínez-Vidal, J. L. *et al.*, 2002 y 2006). Es menos contaminante que los disolventes clorados, aunque puede co-extraer pequeñas cantidades de compuestos de la matriz.

Esta técnica se emplea en alimentos líquidos, muestras acuosas, frutas y vegetales (Araoud, M. *et al.*, 2007). Se prefiere en el análisis de rutina de laboratorios por su simplicidad, rapidez y altas recuperaciones de compuestos que se encuentran en un amplio intervalo de polaridad.

Otras técnicas de extracción empleadas para análisis de pesticidas en alimentos son QuEChERS que es la abreviación en inglés de las palabras: rápido, fácil, barato, efectivo,

robusto y seguro; extracción con fluidos supercríticos, extracción dispersiva en fase sólida, extracción en fase sólida y micro-extracción en fase sólida, extracción asistida con microondas, entre otras. En la Tabla 2 se muestran algunos de los análisis de pesticidas en vegetales empleando diferentes técnicas de extracción, se observan los disolventes empleados y los pesticidas detectados en dicho análisis.

Tabla 2. Técnicas de extracción y pesticidas identificados en análisis de frutas y vegetales

<i>Técnica de extracción</i>	<i>Disolvente</i>	<i>Pasos de limpieza</i>	<i>Pesticidas identificados</i>	<i>Referencia</i>
QuEChERS*	Acetonitrilo	Extracción dispersiva en fase sólida	Isocarbofos, metil isofenfos	Fernández-Moreno, J. L. <i>et al.</i> , 2008 Mezcua, M. <i>et al.</i> , 2009 Lambropoulou, D. A.; Albanis, T. A., 2007 Garrido-Frenich, A. <i>et al.</i> , 2004 y 2005 Martínez-Vidal, J. L. <i>et al.</i> , 2006
	Acetato de etilo	---	De 31 a 130 pesticidas multi-clase	
Sólido-líquido	Acetonitrilo	Extracción dispersiva en fase sólida	78 pesticidas multiclase	Lambropoulou, D. A.; Albanis, T. A., 2007
		---	151 pesticidas multi-clase	Plaza-Bolaños, P. <i>et al.</i> , 2007
	Diclorometano	---	72 pesticidas multi-clase	Lambropoulou, D. A.; Albanis, T. A., 2007
		---	Endosulfán, metamidofos, metalaxil	Martínez-Vidal, J. L. <i>et al.</i> , 2002
Acetona	---	Pesticidas clorados	Butler, J.; Conoley, M. 2007.	
Líquido-líquido	Acetona, éter y diclorometano	Extracción en fase sólida	Clorpirifos	Lambropoulou, D. A.; Albanis, T. A., 2007
Fluidos supercríticos	CO ₂	---	13 pesticidas multi-clase	Araoud, M. <i>et al.</i> , 2007
Asistida con microondas	---	Micro-extracción en fase sólida	Pesticidas multi-clase	Lambropoulou, D. A.; Albanis, T. A., 2007
			Bifentrin, acrinatrin, deltametrin y λ-cihalotrin	Lambropoulou, D. A.; Albanis, T. A., 2007

*QuEChERS: rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro.

2.3.3. Métodos de separación, identificación y cuantificación de pesticidas. Una vez obtenido el extracto orgánico, la mezcla de pesticidas se separa mediante técnicas instrumentales como cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La identificación y cuantificación de los pesticidas se realiza con detectores selectivos que se encuentran acoplados al equipo de GC ó HPLC. Las técnicas

cromatográficas permiten una aproximación eficiente en el análisis de pesticidas. La espectrometría de masa (MS) generalmente se prefiere como detector y sus resultados típicamente son incuestionables (Rubinson, K. A.; Rubinson, J. F., 2001).

En el análisis de pesticidas es importante cubrir el aspecto cuantitativo y cualitativo. Una respuesta cuantitativa no puede existir en el análisis sin un componente cualitativo que proporcione suficiente confianza para alcanzar las necesidades analíticas (Lehotay, S. J. *et al.*, 2008).

Una respuesta cuantitativa no debe darse sin un grado aceptable de conocimiento cualitativo para que el resultado de la medición esté relacionado solamente con el analito y no con algo más. Es importante entender tres conceptos en el análisis de pesticidas.

1. La determinación es un resultado cuantitativo que se obtiene a partir de un método que alcanza un desempeño aceptable para el propósito del análisis (cromatografía de gases (GC) con detector selectivo de un elemento).
2. La identificación es un resultado cualitativo de un método capaz de proveer información estructural (detección MS) que es aceptable para el propósito del análisis. La confirmación es la combinación de dos o más análisis que aportan el mismo resultado (idealmente usando métodos de selectividad ortogonal, basados en diferentes mecanismos químicos).
3. La confirmación requiere que un resultado confirme el otro, así al menos se necesitan dos análisis.

En la sección siguiente se mencionan las características principales de los métodos de separación, especialmente la GC debido a su amplio uso en el análisis de residuos de pesticidas en alimentos y a que fue la técnica de separación empleada en este trabajo.

2.3.3.1. Técnicas de separación: Cromatografía. La cromatografía permite separar entre sí los componentes de una sustancia, y su gran aplicabilidad se debe a la variedad de condiciones que pueden utilizarse para separar dichos componentes. Se pueden utilizar fases móviles distintas (gases, líquidos o fluidos supercríticos) y fases estacionarias

distintas (minerales, polímeros orgánicos e inorgánicos o sólidos recubiertos de líquidos (Rubinson, K. A.; Rubinson, J. F., 2001).

La elección entre la GC y HPLC depende de las características fisicoquímicas de los pesticidas. La GC se emplea principalmente para pesticidas que se vaporizan fácilmente sin degradarse, con puntos de ebullición por debajo de los 250°C y polaridades bajas o intermedias en el análisis. En cambio, HPLC se utiliza para pesticidas muy polares que no son fácilmente vaporizables, con puntos de ebullición por encima de los 200°C y que son lábiles térmicamente (Wylie, P. *et al.*, 2008; Dömötörova, M.; Matisová, E., 2008).

Actualmente el análisis de pesticidas mediante GC, involucra el uso de columnas capilares, las cuales poseen diámetros internos (d.i.) menores a 1 mm, paredes generalmente recubiertas de una película de fase estacionaria. El uso de columnas capilares permite una mejor resolución y separación rápida de componentes comparadas con las columnas empacadas (d.i. mayores a 1 mm), lo que permite realizar más ensayos aumentando el rendimiento en el análisis de muestras, Anexo 2.

Las columnas capilares empleadas en la GC para el análisis de pesticidas en alimentos habitualmente poseen una fase estacionaria generalmente de polímeros de polisiloxano o polietilenglicoles. Además, debido a que los pesticidas en la muestra son de polaridad baja, las columnas capilares son de polaridad baja y se prefieren aquellas con menor sangrado (ms) y superficies inertes. Las columnas capilares *FactorFour* de Varian Inc. y las de *Agilent Technologies* son las más utilizadas en los análisis de residuos de pesticidas, Tabla 3.

Tabla 3. Algunas columnas capilares empleadas en el análisis de residuos de pesticidas en alimentos

<i>Columna capilar</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Características</i>	<i>Referencia</i>
VF-5 ms	<i>FactorFour</i> Varian Inc.	30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm espesor de película	Fernández-Moreno, J. L. <i>et al.</i> , 2008. Garrido-Frenich, A. <i>et al.</i> , 2005, 2007 y 2008 Plaza-Bolaños, P. <i>et al.</i> , 2007 Martínez-Vidal, J. L. <i>et al.</i> 2006
DB-5 ms	<i>Agilent Technologies</i>	30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm espesor de película	Walorczyk, S., 2007
HP-5 ms	<i>Agilent Technologies</i>	30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm espesor de película	Araoud, M. <i>et al.</i> , 2007

Generalmente, la muestra a inyectar se encuentra en estado sólido o líquido y debe ser vaporizada de alguna manera. La temperatura óptima del inyector se determina experimentalmente y en general es igual o superior a la temperatura máxima alcanzada por la columna durante la separación.

Inyectar una muestra en una columna capilar de diámetro inferior a un milímetro es complicado porque la muestra debe ser pequeña para no causar una sobrecarga de la fase estacionaria. Para mantener la cantidad de muestra en el intervalo correcto se emplea el inyector *split/splitless*, que reduce la cantidad de muestra que llega a la cabeza de la columna capilar. Las muestras con concentración baja de analito se inyectan por el método *splitless* y se arrastran mediante el gas acarreador a la columna. Por otro lado, si se utiliza el método *split*, el gas acarreador fluye continuamente, el flujo excesivo se expulsa y sólo una fracción de la muestra llega a la columna.

Además del uso del inyector *split/splitless* se han empleado filtros o rellenos que permiten la inyección de volúmenes grandes de muestra y mejoran el límite de detección. El *Carbofrit*[®], Figura 3, es un relleno altamente inerte, con tamaño de poro uniforme y densidad de empacado constante, que garantiza el flujo constante a través del inserto. De esta forma, se elimina casi completamente el disolvente mediante la adsorción de la muestra en el *Carbofrit*[®] mientras se mantiene el flujo *split* abierto. Después, con el *split* cerrado se calienta el inyector para desorber los compuestos del *Carbofrit*[®] en la columna. Si solo se mantiene poco tiempo caliente el inyector, el *Carbofrit*[®] solamente desorbe los pesticidas a analizar mientras que la muestra se mantiene absorbida en el mismo. Además ayuda a alargar la vida útil de la columna (Mocholí, F., 2001).

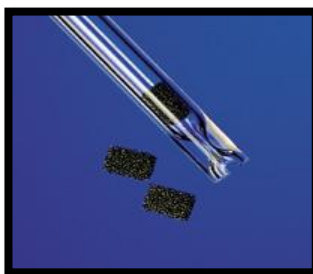


Figura 3. Inserto empacado con *Carbofrit*[®]

Después que la mezcla ha sido separada en el cromatógrafo de gases, cada uno de los componentes se identifica por un detector. Para detectar los componentes separados se miden los cambios que se producen en una serie de propiedades físicas o químicas diferentes. Como la conducción de corriente eléctrica, absorción de luz y habilidad para conducir el calor. El detector registra los cambios que se producen en alguna propiedad del eluyente que pasó por él. A medida que estos cambios son registrados y reproducidos en forma de gráfica o bien almacenados en la computadora y posteriormente reproducidos en forma de gráfica, se observa la aparición de una serie de picos a lo largo del tiempo (cromatograma). En la sección siguiente se mencionan algunos de los detectores empleados en GC.

2.3.3.2. Técnicas de identificación: Detectores. Existe una gran variedad de detectores que pueden estar acoplados al cromatógrafo de gases y permiten identificar los compuestos de interés que se encuentran en la muestra. En la Tabla 4 se enlistan los detectores utilizados, con un resumen de sus características. Los detectores más sensibles han permitido el desarrollo de métodos de análisis de trazas. La GC puede usarse para cuantificar niveles de ppm.

Tabla 4. Propiedades de detectores para GC

<i>Tipo</i>	<i>Características</i>	<i>Referencia</i>
Conductividad térmica	Detector universal Mide cambios en la conducción del calor. Se emplea para identificar hidrocarburos, medir hidrógeno o aire en CO ₂	Rubinson, K. A.; Rubinson, J. F. 2001
Ionización de llama (flama)	Detector universal Mide corrientes iónicas de pirólisis. Sólo para hidrocarburos pues permite detectar los iones de C que se forman durante la combustión a temperatura alta. La mayor desventaja es que no puede emplearse para detectar H ₂ O, N ₂ y CO ₂	Rubinson, K. A.; Rubinson, J. F. 2001
Captura de electrones	Detector selectivo para compuestos que contiene átomos con afinidad electrónica elevada Se emplea para identificar pesticidas organoclorados. Empleado en análisis de frutas, vegetales, jugos, cereales, especias, nueces, carne, pescado, queso, entre otros. Proveen resultados ambiguos. Está sujeto a interferencias por la matriz	Pang, G.-F. <i>et al.</i> , 2006 Kotretsou, S. I. <i>et al.</i> , 2006
Fotométrico de llama y nitrógeno-fósforo	Detector selectivo para compuestos que contienen S ó P y N ó P, respectivamente Detectan pesticidas organofosforados. Proveen resultados ambiguos. Están sujetos a interferencias por la matriz	Uresti-Martín, R. M. <i>et al.</i> , 2008 Rubinson, K. A.; Rubinson, J. F. 2001 Kotretsou, S. I. <i>et al.</i> , 2006

Tabla 4. Continuación

<i>Tipo</i>	<i>Características</i>	<i>Referencia</i>
Detector Hall	Detector específico para compuestos que contienen un halógeno, S ó N	Rubinson, K. A.; Rubinson, J. F. 2001
Detector infrarrojo de transformada de Fourier	Moléculas polares En análisis de composición química y propiedades físicas, puede proporcionar información en tiempo real. Puede realizar análisis cuantitativo de compuestos orgánicos, inorgánicos y sales	Rubinson, K. A.; Rubinson, J. F. 2001
Espectrometría de masa (MS)	Detector universal - Un analizador de masa: Altamente sensible para la elucidación estructural de compuestos químicos. Herramienta útil debido a la disponibilidad de bibliotecas con espectros de pesticidas. Popular en el análisis de contaminantes en alimentos	Lehotay, S. J. <i>et al.</i> , 1997
	- Captura de iones o trampa de iones: Adecuada cuando se emplea la extracción con fluidos supercríticos. Ahorra tiempo, esfuerzo y dinero debido a su habilidad para cuantificar y confirmar una variedad de analitos a concentraciones de trazas en una matriz compleja con una simple inyección. Permite realizar masa en cascada multi-etapa	Rubinson, K. A.; Rubinson, J. F. 2001. Martínez-Vidal, J. L. <i>et al.</i> , 2002
	- Triple cuadrupolo (QqQ): Permite realizar masa/masa o en cascada (MS/MS). Selectividad y sensibilidad en ppm y ppt de pesticidas en muestras complejas como frutas y vegetales. Permite detallar la información estructural de un ión fragmento o la identificación de compuestos encontrados en estas mezclas complejas. El incremento de selectividad de esta técnica reduce la influencia de la matriz y también de los límites de detección bajos	Kotretsou, S. I. <i>et al.</i> , 2006

En esta sección se indican las características y aplicaciones de la MS, debido a que es detector empleado en este trabajo. Primero se mencionarán las generalidades de la MS, posteriormente de la espectrometría de masa/masa o en cascada (MS/MS) y la complementación de la GC con la MS.

La MS da nombre a un conjunto de técnicas utilizadas para la medida de la masa de los iones y su abundancia en la fase gaseosa. Su versatilidad se debe en parte al amplio abanico de posibilidades de las secciones de un espectrómetro de masa que son la fuente de ionización, el analizador de masa y el detector, estas tres secciones se pueden observar en la Figura 4.

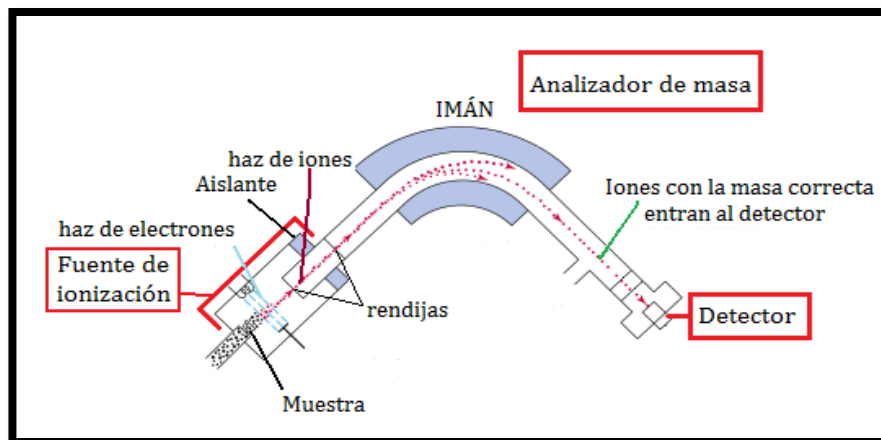


Figura 4. Esquema de las características principales de un espectrómetro de masa

La información que se puede obtener de la MS es extensa, pero una característica de esta técnica es que se puede obtener la masa de un compuesto de interés mediante el ión molecular en el espectro de masa. Este ión molecular es el pico con mayor relación m/z , también se encuentra en el espectro de masa el ión molecular con mayor abundancia relativa y se le conoce como pico base.

Con un equipo adecuado, una de las especies iónicas que se separa de las demás puede fragmentarse y estos fragmentos se conducen a otro espectrómetro de masa para su análisis. Es decir, un segundo espectrómetro de masa se enciende después de que el ión precursor se fragmenta y estos fragmentos o iones producto se identifican. Este método de análisis es muy útil y es llamado espectrometría de masa/masa o en cascada (MS/MS). Cualquier ión seleccionado en el primer analizador de masa se llama ión precursor. La MS/MS puede usarse para elucidar estructuras complicadas de iones originales y determinar componentes de una mezcla de analitos en matrices complejas como los alimentos.

La MS/MS permite la determinación de todos los iones producto generados por el ión precursor. El escaneo con MS/MS ofrece la ventaja de selectividad, examinando los patrones de fragmentación de un ión particular en una mezcla de iones (Garrido-Frenich, A. *et al.*, 2005).

El proceso de MS/MS consiste en ionizar la muestra en la fuente de ionización, después seleccionar una masa determinada en el analizador de masa 1 (AM1) que se pasa a través de una apertura hasta la cámara de colisiones. En la cámara de colisiones, los átomos del gas que se introducen intencionadamente para fragmentar a los iones, inciden sobre éstos produciendo fragmentos neutros y otros iones. Los iones que salen de la cámara de colisión son analizados por el segundo espectrómetro de masa, el analizador de masa 2 (AM2). Esta fragmentación se llama disociación inducida por colisiones. Al escoger los iones producto que son característicos para los pesticidas de interés permite separar el ruido químico de la señal, logrando una sensibilidad y selectividad altas, aun en matrices muy complejas (Wylie, P. *et al.*, 2008), Figura 5.

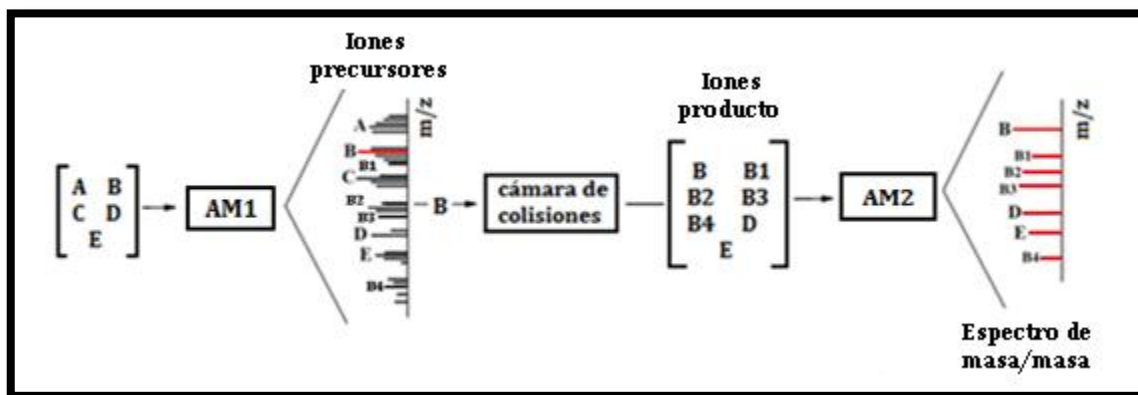


Figura 5. Descripción del funcionamiento de un sistema MS/MS

La muestra que es una mezcla de masas moleculares $A > B > C > D > E$ se puede separar dada la relación m/z . Sin embargo, los iones fragmento de cada molécula se encuentran solapados. El primer separador de masa está preparado para seleccionar un ión precursor, que se introduce en la cámara de colisiones donde se produce la fragmentación mediante colisiones con un gas como el argón o el helio. Por ejemplo, supongamos que se selecciona el ión B. Los iones que ahora tenemos son iones B y los iones producto D, E, B₁-B₄. Éstos se introducen en un segundo separador de masa, el que genera el espectro de masa/masa.

Los experimentos de MS/MS pueden realizarse empleando diferentes tipos de analizadores, los más usados comúnmente en el análisis de pesticidas son la trampa de iones y el triple cuadrupolo (QqQ) (Garrido-Frenich, A. *et al.*, 2008), Figura 6.

Los espectrómetros de masa de trampa de iones pueden medir la relación m/z de los iones que se mantienen dentro de ellos. Tanto los espectrómetros de trampa de iones como espectrómetros de transformada de Fourier son espectrómetros de masa que pueden trabajar en modo de MS/MS. Una desventaja de la trampa de iones es la vulnerabilidad a efectos producidos por una gran cantidad de iones cargados, lo que

afecta la calidad del espectro de masa, incluyendo la resolución y la precisión de la masa, además pueden realizar un solo tipo de monitoreo, el escaneo de un ión seleccionado.

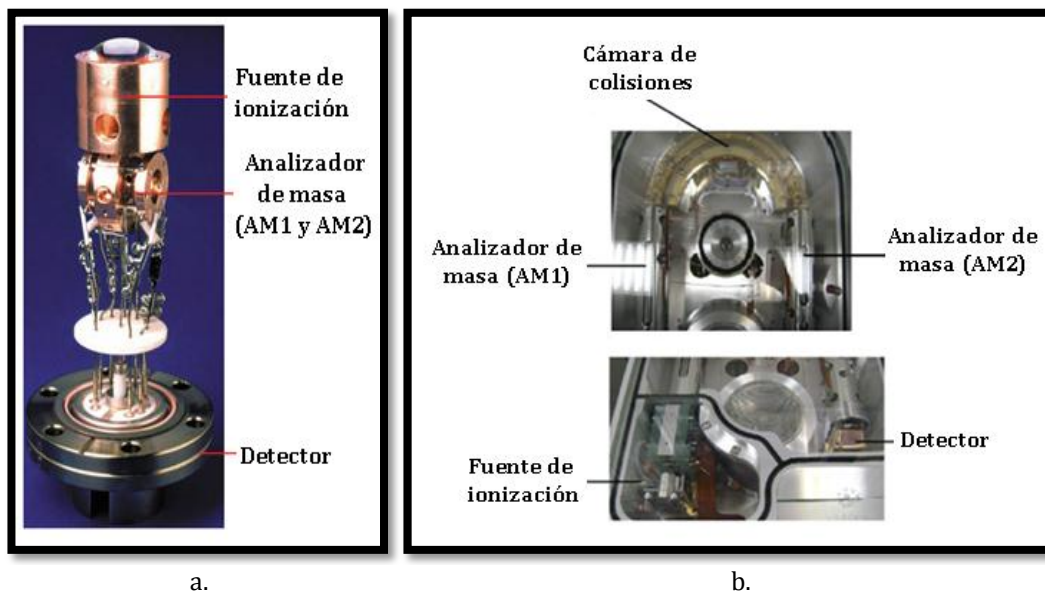


Figura 6. a. Trampa de iones. b. Triple cuadrupolo (QqQ)

En el caso de los equipos de MS/MS con QqQ, el primer analizador de masa (AM1) equivale al primer cuadrupolo, la cámara de colisiones al segundo cuadrupolo, y el tercer cuadrupolo cubre el papel del segundo analizador de masa (AM2), Figura 6b.

Los analizadores QqQ realizan monitoreos más rápidos que la trampa de iones, lo cual influye en el desarrollo del análisis cromatográfico. Se pueden realizar modos de monitoreo diferentes. Uno de ellos es el monitoreo de reacción múltiple, que es más rápido que el monitoreo de un ion seleccionado disponible en la trampa de iones, permite el escaneo, confirmación y cuantificación en un solo análisis. También puede operar en monitoreo de una reacción seleccionada y el monitoreo de un ión seleccionado, estos monitoreos debido a la selectividad alta y rapidez para adquirir datos, permiten identificar y cuantificar simultáneamente un gran número de residuos de pesticidas diferentes a niveles traza en matrices complejas. Sin embargo, una desventaja de operar en estos dos modos es que solo se monitorean los compuestos seleccionados y no todos los pesticidas presentes como lo permite un escaneo completo (*full scan*) (Garrido-Frenich, A. *et al.*, 2008).

Para abatir este problema, pueden realizarse métodos analíticos de respuesta binaria para reducir costos, minimizar errores, aumentar la rapidez y simplicidad. Estos métodos consisten en realizar un escaneo completo de la muestra para determinar si existen o no los residuos de pesticidas de interés. Si en la muestra se identifican los pesticidas seleccionados, se analiza nuevamente para realizar la confirmación y cuantificación.

En los instrumentos de trampa de iones, se añaden pasos intermedios que dependen del tiempo necesario para mantener y mover iones. De esta manera, un fragmento puede aislarse y fragmentarse, y volver a aislarse, y así llevar a cabo numerosos análisis $(MS)^n$, donde n es el número de pasos intermedios, también conocido como espectrometría de masa en cascada de multi-etapa.

Esa técnica se emplea cuando la MS/MS no provee suficiente información de fragmentación. La $(MS)^n$ solo puede desarrollarse en instrumentos que emplean trampa de iones y ciclotrón iónico (transformada de Fourier), los cuales permiten la re-fragmentación de iones producto (iones fragmento de MS/MS). En la primera etapa, el espectro de masa sencillo se produce de manera usual. En la segunda etapa, se aísla un ión precursor originado por disociación inducida por colisiones de la misma manera que en la MS/MS. En la MS/MS, el experimento termina aquí, cuando los iones producto son consumidos por el detector; sin embargo, en $(MS)^n$ todavía los iones producto son atrapados para permitir otro proceso de aislamiento y fragmentación resultando en un espectro MS^3 . Este proceso puede repetirse un número de veces determinado, resultando en una serie de espectros $(MS)^n$, Figura 7.

La MS/MS es muy específica en la identificación de compuestos de interés, proveen alta selectividad y sensibilidad. Incuestionablemente, con la MS/MS se obtiene un mayor grado de certeza en la identificación de analitos que en una técnica de MS de una sola etapa, debido a que se evitan las interferencias y se puede resolver un espectro multi-componente.

Dado que las dos formas más comunes de ionizar las muestras son el uso de electrones a gran velocidad conocido como impacto electrónico (EI) y el uso de un gas como

hidrógeno, metano o amoníaco, llamada ionización química (CI), se describe brevemente cada una de ellas.

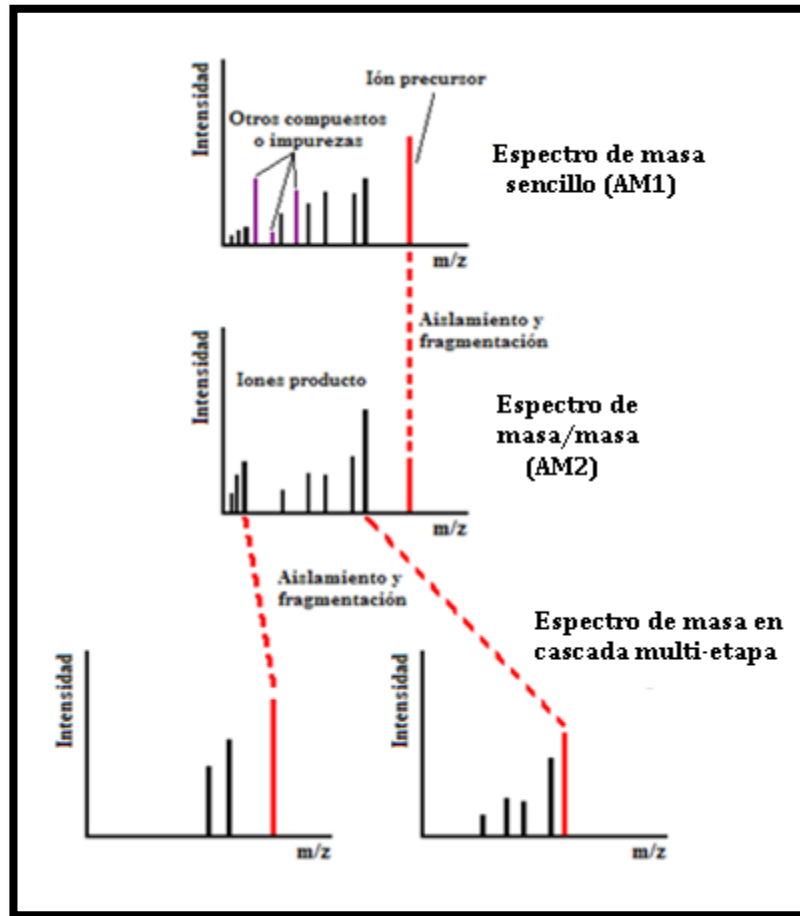


Figura 7. Espectro hipotético de masa en cascada multi-etapa (MS^3)

Los iones que se forman por EI tienen casi la misma energía cinética y generan un haz de iones mono-energético. Por otro lado, las fuentes de CI suavizan las condiciones de ionización de la muestra. En la CI se presenta una menor fragmentación que en la EI, debido a que hay menos energía "en exceso" (por encima de la que se necesita para la ionización) disponible para romper y reorganizar los enlaces químicos. La diferencia en la fragmentación entre EI y CI muestra la división entre ionizaciones de baja y alta energía y colisiones que dan lugar a diferentes fragmentaciones. Los procesos de alta energía incluyen la EI y colisiones en la MS/MS en la cámara de colisiones seguida de separación en el sector magnético del instrumento.

Como se puede apreciar, una de las aplicaciones más importantes de la MS es la capacidad de identificar especies moleculares y atómicas. Sin embargo, cuando se tiene un sólo analizador de masa en el espectrómetro de masa y una mezcla compleja de moléculas por cuantificar, los resultados no son inequívocos. Esta situación se resuelve cuando el espectrómetro de masa puede generar experimentos de MS/MS.

Por otro lado, la cromatografía de gases posee una capacidad importante para separar mezclas en sus componentes individuales. No obstante, estos métodos flaquean a la hora de la identificación de los componentes separados.

Por tanto, la complementariedad de los métodos de espectrometría y de separación hace que el uso de la MS/MS para detectar e identificar los compuestos ya separados de una mezcla constituye, probablemente, el método más importante entre los métodos de análisis.

La evolución de la MS/MS ha ofrecido una herramienta fuerte y útil para la determinación de contaminantes en alimentos, además empleando un aparato QqQ junto con la GC representan una opción estratégica para la determinación incuestionable de analitos en niveles entre ppm y ppb, ya que combina las capacidades de separación de la cromatografía y el poder de la MS/MS como un método de identificación y confirmación (Kotretsou, S. I. *et al.*, 2006). Debido a lo anterior, esta alternativa se utilizó en el presente trabajo.

2.4. Estudios relacionados

En general, los análisis multi-residuos más recientes han desarrollado, validado y aplicado la técnica de GC-MS/MS a diferentes alimentos, para identificar y cuantificar inequívocamente cantidades de ppm de pesticidas con diferentes características.

En la Tabla 5 se muestran algunos de los análisis reportados. Éstas técnicas son empleadas frecuentemente para realizar el monitoreo de residuos de pesticidas, obteniendo resultados confiables y validando así el método de análisis.

Tabla 5. Análisis de residuos de pesticidas en frutas, vegetales y cereales

Alimento	Técnica extracción	Técnica identificación y cuantificación	Pesticidas identificados	Concentración detectada (mg/kg)*	LMR (mg/kg) ^a	Referencia	País
Kiwi, durazno	Sólido-líquido	GC ó HPLC MS	Malatión Metamidofofos	0.70	0.02 ^b	Hill, A. R. C.; Reynolds, S. L., 2002	USA
				1.21	0.01 ^c		
Fresas	Sólido-líquido	GC-QqQ-MS	151 pesticidas multi-clase	Validación del método	---	Plaza-Bolaños, P. <i>et al.</i> , 2007	España
Pepino, chile, jitomate, sandía, melón	Sólido-líquido	GC-MS/MS	31 pesticidas multi-clase	Muestras por arriba de LMR: Chile: 1.7%, pepino: 3.8%, jitomate: 0.6%	---	Martínez-Vidal, J. L. <i>et al.</i> , 2002.	España
Jitomate, chile	Fase sólida	GC/Captura de electrones	Captan Endosulfán	0.006-0.1	0.1 ^d 0.5 ^e	Columé, A. <i>et al.</i> , 2001	España
Jitomate, chile	Sólido-líquido + extracción dispersiva en fase sólida	GC-QqQ-MS/MS	Endosulfán	0.01-0.61	0.5 ^e	Fernández-Moreno, J. L. <i>et al.</i> , 2008	España
			Malatión	0.02-0.16	0.1 ^f		
Jitomate orgánico	Soxhlet	GC/Captura de electrones	Endosulfán Lindano DDT DDE	0.16	0.5 ^e	González, M. <i>et al.</i> , 2003	Argentina
Cereal, maíz, trigo	QuEChERS y extracción dispersiva en fase sólida	GC-QqQ-MS/MS	Malatión	0.038	8 ^g	Walorczyk, S. 2007	Polonia
Zanahoria	Sólido-líquido	GC/Captura de electrones	Lindano DDT	3.9 ± 2.7 71.0 ± 28.9	0.01 ^h 0.05 ⁱ	Waliszewki, S. M. <i>et al.</i> , 2008	México

*En muestra fresca.

a. Directiva 91/414/ECC.

b. LMR de malatión para kiwi.

c. LMR de metamidofofos para kiwi y durazno.

d. LMR de captan para chile.

e. LMR de endosulfán para jitomate.

f. LMR de malatión para chile.

g. LMR de malatión para cereales.

h. LMR de Lindano para zanahoria.

i. LMR de DDT para zanahoria.

QuEChERS: rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro.

GC: cromatografía de gases.

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución.

MS: espectrometría de masa.

MS/MS: espectrometría de masa/masa o en cascada.

QqQ: triple cuadrupolo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para efectuar el análisis de residuos de pesticidas en calabacita, tomate verde y jitomate saladette, se realizó un muestreo en el mercado local Zaragoza de la ciudad de Huajuapán de León y en un mercado orgánico de la ciudad de Oaxaca. La extracción de los residuos de pesticidas en estos vegetales, se realizó con la técnica sólido-líquido y la separación, identificación y cuantificación mediante GC-MS/MS.

Para obtener resultados confiables del análisis, además de seleccionar las técnicas correctas para la extracción y determinación de los residuos de pesticidas, se establecieron las condiciones adecuadas en el equipo de GC-MS/MS, se realizó la limpieza del material de vidrio y se purificaron algunos de los disolventes y reactivos.

En esta sección se describen reactivos y disolventes, equipo y material, muestreo de los vegetales, técnica de extracción, condiciones en el sistema de GC-MS/MS y métodos de separación, identificación y cuantificación empleados en la investigación.

3.1. Disolventes y reactivos

Los reactivos y disolventes empleados en el análisis de residuos de pesticidas de los vegetales se muestran en la Tabla 6. Con la finalidad de purificar la acetona, el acetato de etilo y el hexano se bi-destilaron en rotavapor y después por destilación fraccionada. El etanol se sometió a destilación simple, el resto de los disolventes, como cloruro de metileno y metanol, no se destilaron. Los disolventes se almacenaron a temperatura ambiente en frascos de vidrio protegidos de la luz hasta el momento de su uso. La cafeína (estándar interno), se purificó cristalizándola tres veces con una solución de etanol/agua (85/15), el punto de fusión de los cristales obtenidos fue de 234–236°C (234-236.5°C (lit.)).

Tabla 6. Características de los disolventes y reactivos empleados en el análisis de pesticidas

<i>Disolvente/Reactivo</i>	<i>Pureza (%)</i>	<i>Marca</i>	<i>Temperatura rotavapor (°C)</i>
Acetona	99.5	JT Baker	59 (sin vacío)
Acetato de etilo	99.9	Fermont	48 (con vacío)
Etanol	99.5	Omnichem	---
Hexano	99.3	Fermont	48 (con vacío)
Metanol	99.9	Sigma-Aldrich	---
Cloruro de metileno	99.9	Golden Bell	---
Sulfato de sodio anhidro (Na ₂ SO ₄)	100	JT Baker	---
Cloruro de sodio (NaCl)	---	La Fina	---
Cafeína	98	Analytyka reactivo	---

Para realizar las soluciones patrón de pesticidas, se pesó la cantidad de polvo o líquido de cada pesticida y se aforó con etanol, las soluciones patrón se almacenaron en congelación a -20°C. Las características de los pesticidas así como las concentraciones de las soluciones patrón se muestran en la Tabla 7. Se preparó una solución patrón etanólica de cafeína con una concentración de 50 ppm.

Tabla 7. Características de los pesticidas utilizados como estándares

<i>Pesticida</i>	<i>Pureza (%)</i>	<i>Marca</i>	<i>Concentración solución patrón (ppm)</i>
Captan	99.1	Riedel-de Haën	200
Carbofurán	99.9	Fluka Analytical	200
Endosulfán	99.9	Riedel-de Haën	200
Malatión	96.1	Riedel-de Haën	100
Metamidofos	98.4	Fluka Analytical	200

A partir de las soluciones patrón, se prepararon soluciones etanólicas de trabajo STA con concentraciones de: 1.0, 5.0 y 10 ppm de cada pesticida, cada solución de trabajo contenía 2.0 ppm de cafeína. Además se prepararon soluciones etanólicas de trabajo STB con las concentraciones siguientes: 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm de cada pesticida a partir de las soluciones patrón, cada solución contenía 0.5 ppm de cafeína. Todas las soluciones etanólicas de trabajo se mantuvieron en refrigeración a 4°C.

3.2. Equipo, material en general e instrumentación

Los equipos empleados durante el análisis fueron: mezclador casero marca Osterizer (modelo 465-42), vortex Barnstead/Thermolyne International (tipo 16700 Mixer Maxi-Mix I, modelo M16715), balanza analítica digital Sartorius (modelo TE214S), bomba de vacío de membranas Vacuumbrand (modelo MZ 2C), sistema de recirculación de agua SEV (modelo ECO 10), rotavapor Heidolph (modelo LABOROTA 4000), refrigerador marca Acros automático (modelo ARP08TXLQ/LT), congelador GE (modelo FUM14DTRWH), sonicador Branson (modelo 8510) y campana de extracción LABCONCO (#301116).

Se utilizó material de vidrio de laboratorio diverso. Para eliminar residuos de pesticidas, todo el material utilizado se lavó siguiendo el tratamiento de lavado de la EPA (método 1668, revisión A, 2003). Se usaron micropipetas de graduación diferente, filtros Econofilter 25 de Agilent Technologies de 0.45 μm , filtros Minisart de Sartorius de 0.20 μm , envases de polipropileno de 2 L y jeringas de plástico de 10 mL.

Se utilizó un cromatógrafo de gases 3800 Varian (Varian Instruments Sunnyvale, CA) equipado con control de flujo electrónico e inyector 1177 *split/splitless*. El inserto se equipó con *Carbofrit*[®] (Resteck, Bellefonte, PA).

Se utilizó una columna capilar de gel de sílice fundida sin tratar (100% dimetilsiloxano), VF-1ms, *FactorFour*[®] de 30 m x 0.25 mm d. i. x 0.25 μm de grosor de película de Varian Instruments. Esta columna al igual que la VF-5ms se emplea para el análisis de rutina a nivel de trazas de pesticidas y otros compuestos (hidrocarburos aromáticos, alcoholes, aromas, ácidos grasos libres, ácidos orgánicos, polímeros, esteroides). Difieren en la composición de la fase estacionaria, la VF-5ms es ligeramente más polar que la VF-1ms, sin embargo ambas se emplean en el análisis de pesticidas. La columna VF-1ms es altamente inerte, no polar, tiene muy bajo sangrado, una relación señal a ruido (S/R) alta (Garrido-Frenich, A. *et al.*, 2007 y 2008).

Se empleó Helio (99.999 ó 99.9999%) como gas acarreador, con un flujo de 1 mL/min. El cromatógrafo de gases (3800 Varian) se conectó a un espectrómetro de masa de triple cuadrupolo Varian 1200L operado con ionización electrónica (EI, 70 eV) como fuente de

iones. De la fuente de ionización, los iones pasan a través de un hexapolo que guía los iones al analizador de masa (intervalo de masa de 10 a 1500 uma). La celda de colisión curva presenta un camino de 180°. Se empleó argón (99.999%) como gas de colisión para los experimentos masa/masa. El espectrómetro de masa se calibró semanalmente con perfluorotributilamina. La computadora cuenta con una biblioteca EI-MS/MS (NIST).

3.3. Recolección y almacenamiento

Los vegetales se muestrearon con base en la Directiva 2002/63/CE del Diario Oficial de la CE, en la que se establecen los métodos comunitarios de muestreo para el control oficial de residuos de plaguicidas en los productos de origen vegetal y animal. La calabacita (CAL) y el tomate verde (TV) se adquirieron en el mercado Zaragoza de la ciudad de Huajuapán de León, Oaxaca, en los meses de noviembre y diciembre de 2008 y enero de 2009. Asimismo, se recolectaron tres muestras diferentes de jitomate saladette, dos muestras se adquirieron directamente con productores de la región Mixteca Oaxaqueña (JSA y JSB).

Con el objetivo de tener una muestra control, una muestra de jitomate saladette orgánico (JSO) se recolectó en un mercado orgánico de la ciudad de Oaxaca dado que en la región mencionada no se realizan cultivos orgánicos. Cabe señalar que el JSO de acuerdo al productor no recibió aplicación de pesticidas. Sin embargo, se realizó el análisis de los pesticidas estudiados en este trabajo.

JSA, JSB y JSO se adquirieron en noviembre de 2008. El lugar de origen de cada vegetal se menciona en la Tabla 8.

Tabla 8. Origen de los vegetales estudiados

<i>Vegetal</i>	<i>Clave</i>	<i>Procedencia</i>
Calabacita	CAL	San Francisco el Huamuchil, Oaxaca
Tomate verde	TV	Chila de las Flores, Puebla
Jitomate saladette A ^a	JSA	La Luz Nagore, Oaxaca
Jitomate saladette B ^a	JSB	La Luz Nagore, Oaxaca
Jitomate saladette orgánico	JSO	San Andrés Huayuapam, Oaxaca

a. Cultivados por productores diferentes.

Con base en la Directiva 2002/63/CE, los vegetales se consideraron como productos frescos a granel de tamaño medio (unidades de 25 a 250 g, dependiendo del vegetal seleccionado) sin homogenizar. El número mínimo de muestras primarias que se tomaron dependió del número mínimo de unidades necesario para la muestra de laboratorio, Tabla 9. En la medida de lo posible, las muestras primarias se tomaron al azar de un lugar del lote.

Se adquirieron 2 kg de cada vegetal, esta cantidad se lavó y se molió en el mezclador casero. Aquellas muestras que no se analizaron en ese momento, se guardaron en envases de polipropileno y se almacenaron en refrigeración (4°C) hasta su extracción. El tiempo de almacenamiento no fue mayor a 48 horas.

Tabla 9. Descripción de las muestras primarias y tamaño mínimo de las muestras de laboratorio*

<i>Clasificación de los productos</i>	<i>Ejemplos</i>	<i>Naturaleza de las muestras primarias que han de tomarse</i>	<i>Tamaño mínimo de cada muestra de laboratorio</i>
Productos frescos de tamaño pequeño, unidades generalmente < 25 g	Bayas, guisantes, aceitunas	Unidades enteras, o envasadas, o tomadas con un instrumento de muestreo	1 kg
Productos frescos de tamaño medio, generalmente unidades de 25–250 g	Manzanas, naranjas	Unidades enteras	1 kg (al menos 10 unidades)
Productos frescos de tamaño grande, generalmente unidades de > 250 g	Coles, pepinos, uvas (racimos)	Unidades enteras	2 kg (al menos 5 unidades)

* Aplica a todas las hortalizas frescas, incluidas papas y betabel, exceptuando hierbas aromáticas. Directiva 2002/63/CE de la comisión del 11 de julio de 2002.

Inmediatamente después de la adquisición de cada muestra, se sometió a lavado con jabón y agua corriente, se escurrió, y cuando fue necesario, se separaron las partes no comestibles y se cortaron en trozos de menor tamaño para facilitar la molienda. Se molieron de 1 a 2 min en el mezclador casero hasta obtener una mezcla homogénea con consistencia de papilla, Figura 8.

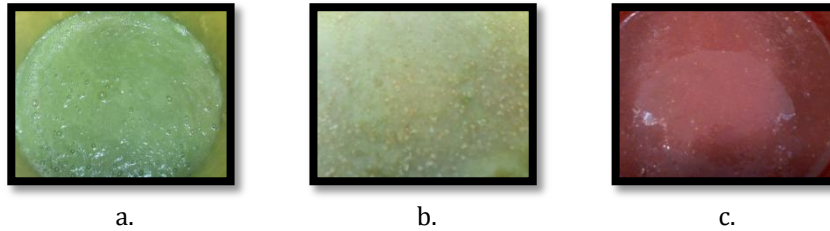


Figura 8 Vegetales molidos. a. calabacita (*Cucurbita pepo*), b. tomate verde (*Physalis ixocarpa*) y c. jitomate saladette (*Lycopersicum esculentum*)

3.4. Extracción de residuos de pesticidas de los vegetales

La técnica de extracción sólido-líquido consistió en el siguiente procedimiento. Para cada réplica (10 réplicas por vegetal), se tomó una porción representativa de los 2 kg de vegetal homogenizado y se dejó atemperar de 30 a 50 min. Se pesaron aproximadamente 5 g y se mezclaron con 10 mL de acetato de etilo. Se agitó durante 10 minutos en vortex. Se filtró a través de algodón para eliminar el material vegetal y se enjuagó con 5 mL de acetato de etilo. Las fases orgánicas se mezclaron.

Posteriormente, sólo en el caso de los jitomates saladette y el tomate verde, se transfirió el acetato de etilo a un embudo de separación para eliminar la mayor cantidad de agua posible.

La fase orgánica se separó y el embudo de separación se enjuagó con 4–5 mL de acetato de etilo. Para eliminar el agua de las muestras se empleó sulfato de sodio anhidro y cloruro de sodio. Se agregó a la fase orgánica 1 g de cada sal para la calabacita, 1.5 g de cada sal para el tomate verde y el jitomate saladette.

El acetato de etilo se filtró a través de un embudo con algodón y fibra de vidrio, y se enjuagó con 5–7 mL de acetato de etilo. El disolvente se evaporó hasta sequedad en el rotavapor a vacío a una temperatura de 39–40°C. Se trasvasó el extracto a viales con 2–4 mL de acetona.

La acetona se evaporó en campana de extracción de gases. Los tiempos necesarios para evaporar el disolvente en los extractos de calabacita, tomate verde y jitomate saladette

fueron de: 3–3.5 horas, 2.5 horas y 3.5–4 horas, respectivamente. Los viales se taparon y sellaron con parafilm y se guardaron en congelación a -20°C.

En el momento de su análisis, el extracto se re-suspendió con 1000-2000 µL de hexano, se filtró a través de Econofilter 25 de Agilent Technologies de 0.45 µm y después a través de un filtro Minisart de Sartorius de 0.20 µm. El re-disolver el extracto de acetato de etilo en hexano permitió disminuir la disolución de co-extraídos (pigmentos y ácidos grasos), y minimizar interferencias durante el análisis en el equipo de GC-MS/MS.

Se evaporó el hexano hasta sequedad con una corriente de aire y se agregaron 200 µL de etanol con 0.5 o 2.0 ppm de cafeína. Se tomaron alícuotas de 1 µL de este extracto y se inyectaron directamente en el equipo de GC-MS/MS.

Es importante mencionar que el acetato de etilo tiene una polaridad media y capacidad de extracción de compuestos en un intervalo amplio de polaridad, tal como los pesticidas. Los pesticidas, motivo del presente estudio tienen diferente polaridad entre sí pero todos son solubles en acetato de etilo. Metamidofos y carbofurán son ligeramente solubles en agua. Malatión es poco soluble en agua; captan y endosulfán no son solubles en agua. Además, la efectividad de la extracción de residuos de pesticidas empleando acetato de etilo desde matrices vegetales está demostrada en la literatura, se reportan porcentajes de recuperación entre 70 y 110%, (Garrido-Frenich, A. *et al.*, 2005; Fernández-Moreno, J. L. *et al.*, 2008; Martínez-Vidal, J. L. *et al.*, 2006).

Aunque generalmente se usan pasos de limpieza adicionales para aumentar la selectividad del método de extracción y minimizar las interferencias durante la identificación, el empleo del *Carbofrit*® en el inserto del inyector, permitió la retención de la mayor parte de las interferencias de la matriz, y ayudó a eliminar pasos de limpieza adicionales (Garrido-Frenich, A. *et al.*, 2005).

3.5. Condiciones en el equipo de GC-MS/MS

Para realizar los análisis en el equipo de GC-MS/MS, se probaron diferentes condiciones para establecer aquellas que dieran los resultados mejores, es decir, que permitieran

obtener una separación mejor de los pesticidas, mejor resolución de los iones precursores y producto y un tiempo de análisis corto.

Cuando el equipo de GC trabajó con He de una pureza de 99.999%, se analizaron soluciones de trabajo con concentraciones relativamente altas, de 10 a 100 ppm de cada compuesto. El He contenía nitrógeno, agua y oxígeno en concentraciones que disminuyeron la sensibilidad del equipo. Sin embargo, fue suficiente para establecer condiciones de operación empleando soluciones de trabajo con concentraciones mayores de 40 ppm.

Posteriormente, con He de una pureza de 99.9999%, la sensibilidad del equipo aumentó y permitió realizar el análisis de soluciones de trabajo de 0.5 a 2.0 ppm y también de los extractos de las muestras vegetales, en las que la concentración de los residuos de pesticidas se esperan por debajo de 10 ppm.

Uno de los primeros pasos consistió en probar diferentes temperaturas en la columna y relaciones *split*, para obtener el programa de temperaturas y la relación *split* que permitieran la mejor separación de los pesticidas.

También se ensayaron tres temperaturas en el inyector (200, 230 y 280°C). Se estableció 230°C como la temperatura más adecuada para la desorción de los pesticidas del *Carbofrit*®. La relación del inyector *split* fue inicialmente de 10. Al tiempo 0.01 min, la relación *split* fue de 20. Al minuto 1.0 la relación del *split* fue de 50, y al minuto 12.0 la relación del *split* se apagó. El programa de temperatura en la columna y el tiempo total de la corrida se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Programa de temperatura empleado en la columna

<i>Temperatura</i> (°C)	<i>Velocidad</i> (°C/min)	<i>Tiempo de espera</i> (min)	<i>Tiempo total</i> (min)
100	-	1.5	1.50
180	20	1.0	6.50
200	20	-	7.50
225	20	0.6	9.35
250	25	1.0	11.35
280	20	-	12.85

La combinación apropiada del programa de temperatura en el horno del cromatógrafo de gases y la relación *split* favorecieron la mejor separación de los pesticidas, picos definidos y relaciones S/R ≥ 600 .

Bajo las condiciones de operación establecidas para el equipo de GC y debido a la afinidad de cada compuesto estudiado por la columna capilar, los pesticidas y el estándar interno se identificaron en el orden que se muestra en la Figura 9.

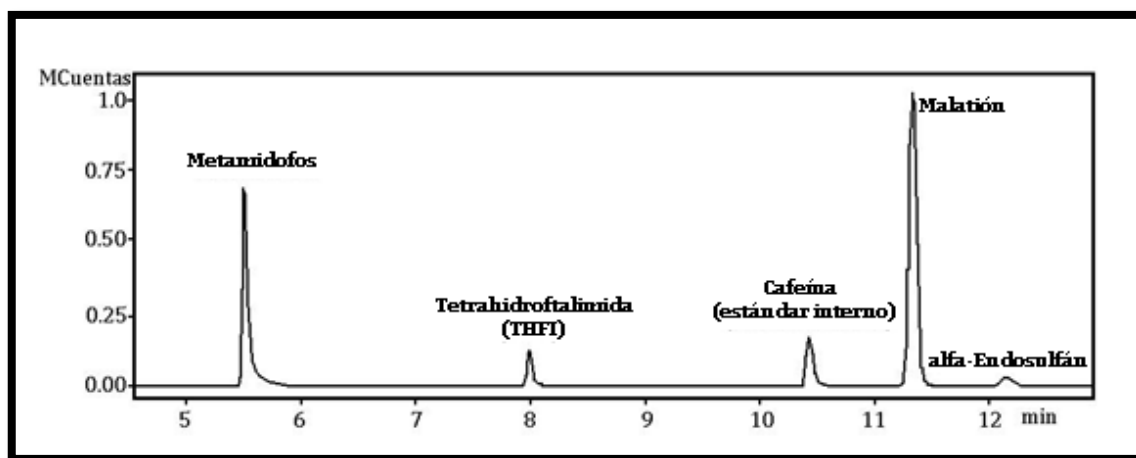


Figura 9. Cromatograma de la solución de trabajo a 40 ppm de cada compuesto

En cuanto a las condiciones establecidas en el espectrómetro de masa, éste trabajó en modo de impacto electrónico (EI) para la ionización de la muestra, porque es adecuado para la mayoría de los compuestos (Garrido-Frenich, A. *et al.*, 2005, 2007 y 2008).

En la línea de transferencia y fuente de ionización las temperaturas de operación se establecieron en 280 y 250°C, respectivamente. En ambos casos, temperaturas mayores (300 y 280°C, respectivamente) no mejoraban la abundancia relativa ni la relación S/R de los iones producto. Temperaturas menores (180 y 150°C) sólo permitían visualizar uno de los iones producto, debido probablemente a que la energía suministrada para la fragmentación era insuficiente.

El análisis se llevó a cabo con un filamento multiplicador con un tiempo de espera de encendido de 3.0 min para prevenir daños al equipo. La corriente en el filamento se estableció en 50 μA y la energía de ionización en 70 eV. Se observó que dos de los tres

iones producto elegidos para cada uno de los pesticidas tenían una relación S/R $\gg 10$ e intensidades en el orden de kilo-cuentas (kC), el tercer ión presentó una relación S/R < 4 , la calidad del pico era muy pobre y tenía intensidades menores a 15 cuentas.

El espectrómetro de masa de QqQ operó en el modo MS/MS y realizó el monitoreo de una reacción seleccionada. El modo de monitoreo de una reacción seleccionada, incrementa la selectividad del triple cuadrupolo (QqQ), ya que el análisis de masa se concentra en el analizador de masa 1 y 2 (AM1 y AM2). También se incrementa la sensibilidad debido a que se obtienen relaciones S/R altas (Garrido-Frenich, A. *et al.*, 2005, 2007 y 2008).

La temperatura del sistema (*manifold*) fue de 40°C. La presión en el *manifold* osciló entre 8.6–9.0 e^{-6} Torr. El argón (99.999%) se estableció a una presión de 1.22–1.30 mTorr, presiones por debajo de 1 mTorr y por arriba de 1.35 mTorr, no mejoraban la estabilidad de los iones producto, disminuía la intensidad de los picos en el cromatograma y la abundancia relativa en el espectro. El detector trabajó a 1500 V y el tiempo de escaneo de los iones fue 0.5 segundos

Para elegir al ión precursor de cada compuesto se realizó un análisis *full scan* en un intervalo de 50–500 *m/z*. Se seleccionó como ión precursor, el ión con mayor relación *m/z* y mayor abundancia relativa en el espectro de masa. Los iones precursores seleccionados en su mayoría coincidieron con los reportados en la literatura (Plaza-Bolaños, P. *et al.*, 2007; Garrido-Frenich, A. *et al.*, 2004 y 2005).

El ión precursor se sometió a disociación por colisión inducida con el gas de colisión, asignando energías de colisión a cada ión producto monitoreado. En la Tabla 11, se observan los iones precursores y los iones producto para cada pesticida y estándar interno así como las energías de colisión asignadas a cada ión producto, éstas variaron desde -5 hasta -15 V. Las energías de colisión seleccionadas fueron aquellas que permitían obtener iones producto con relación S/R $\gg 10$, con intensidades en mega-cuentas (MC) y abundancias relativas altas en el espectro de masa.

En la Tabla 11, se observa que el endosulfán se identifica y cuantifica mediante el isómero alfa. Los isómeros alfa y beta se encuentran en relación 7:3 en las formulaciones

comerciales y en los estándares. El isómero alfa se detectó mejor que el beta, ya que los iones producto en el cromatograma tuvieron mayor intensidad y en el espectro de masa mayor abundancia relativa, por lo que se eligió para realizar la identificación y cuantificación en las muestras de vegetales estudiados (Garrido-French, A. *et al.*, 2005).

Tabla 11. Estructuras de los pesticidas y estándar interno, iones precursoros e iones producto

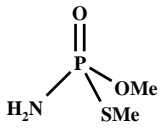
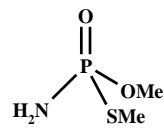

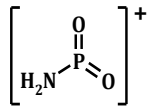
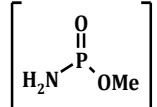
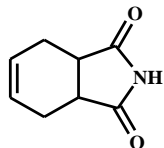
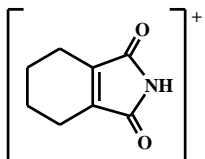
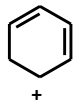
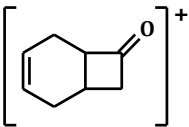
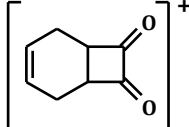
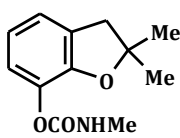
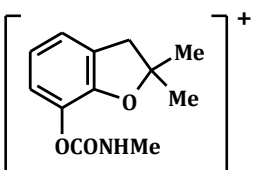
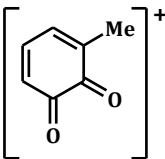
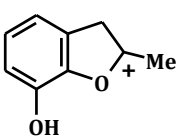
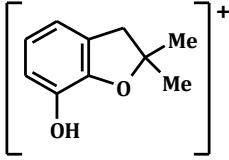
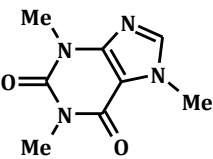
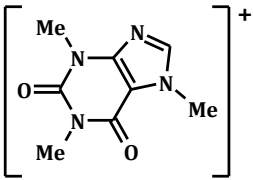
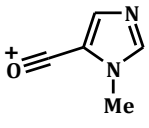
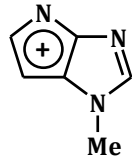
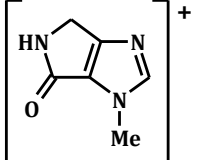
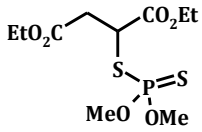
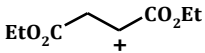
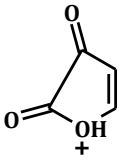
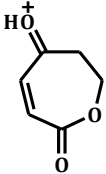
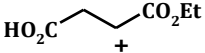
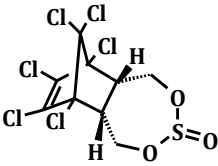
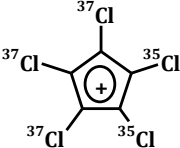
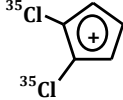
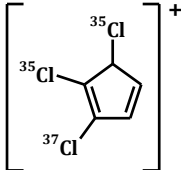
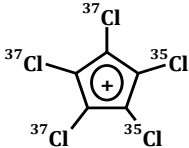
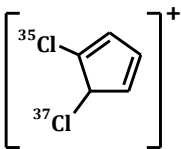
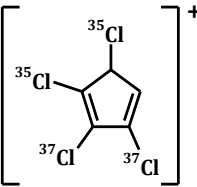
<i>Estructura y nombre (g/mol)</i>	<i>Ión precursor, m/z</i>		<i>Iones producto, m/z (V)</i>	
 Metamidofos (141)	 141	 64 (-15)	 79 (-15)	 94 (-15)
 Tetrahydroftalimida (THFI) (151)	 151	 79 (-10)	 122 (-10)	 136 (-5)
 Carbofurán (221)	 221	 122 (-5)	 149 (-10)	 164 (-10)
 Cafeína (194)	 194	 109 (-15)	 120 (-10)	 137 (-5)

Tabla 11. Continuación

<i>Estructura y nombre (g/mol)</i>	<i>Ión precursor, m/z</i>	<i>Iones producto, m/z (V)</i>		
 Malatión (330)	 173	 99 (-15)	 127 (-10)	 145 (-5)
 alfa-Endosulfán (404)	 241	 133 (-10)	 170 (-10)	 241 (-5)
		 136 (-5)	 206 (-5)	

3.6. Métodos de identificación y cuantificación

Una vez establecidas las condiciones de operación del equipo de GC-MS/MS, se generaron dos curvas de calibración usando diferentes grupos de soluciones de trabajo, STA y STB. Las soluciones de trabajo difieren en la concentración de los pesticidas y del estándar interno, para STA son 1.0, 5.0 y 10 ppm de cada pesticida con 2.0 ppm de cafeína (estándar interno) y para STB son 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm de cada pesticida con 0.5 ppm de cafeína.

El uso de dos curvas de calibración se debió a que los pesticidas en los vegetales estudiados se encontraron en concentraciones muy variables. La curva de calibración STA

se utilizó para cuantificar metamidofos, mientras que la curva de calibración STB sirvió para cuantificar el resto de los pesticidas.

Las condiciones para la construcción de las curvas de calibración se describen en la Tabla 12. Tales condiciones implican restricciones que van desde el ajuste de la línea base del cromatograma hasta límites en el tamaño de la ventana de búsqueda de los iones cuantificadores y calificadores.

Tabla 12. Parámetros para el método de cuantificación para las soluciones de trabajo de 1.0 ppm y de 0.5 ppm

<i>Parámetro</i>	<i>Especificación</i>	<i>Descripción</i>
Tipo de ruido	Pico a pico	Corrige variaciones en la línea base
Tipo de medición	Área	Es más recomendable que medir la altura
Tipo de calibración	Estándar interno	Relaciona el área de la cafeína con el área del pesticida
Intervalo para el ión	Absoluto	-
Integración cualitativa	Independiente	El pico del ión calificador y cuantificador se integran por separado con tiempos de inicio y final diferentes
Ión cuantificador	-	Se selecciona el ión de mayor intensidad en el espectro
Ión(es) calificador(es)	-	Se escogen los iones que aparecen en el espectro de referencia de cada pesticida
% incertidumbre	30%	Representa el porcentaje de desviación de la relación ión calificador/ión cuantificador
Factor de peso de regresión	$1/nx^2$	Se recomienda en análisis a nivel de trazas
Ancho de pico	4-18	Promedia irregularidades y tiende a agrupar picos muy pequeños y desplazados
Ventana de búsqueda	± 0.20 min	± 12 segundos
% mínima abundancia	200-700 cuentas	Intensidades debajo del valor designado se ignoraron

Para construir las curvas de calibración, al cromatógrafo de gases se le inyectó 1 μ L del extracto o de las soluciones estándar de los pesticidas. Se monitorearon dos o tres iones producto de cada pesticida en el segmento correspondiente. El ión precursor y los iones producto de los pesticidas se muestran en la Tabla 13.

Además, se crearon los métodos de identificación y cuantificación para cada serie de soluciones de trabajo (STA y STB). En ambos métodos se construyeron tablas de compuestos a partir de la solución de trabajo más diluida. En estas tablas, se establecieron las condiciones de identificación (iones calificadores, tiempo de retención, intensidad, porcentaje de tolerancia, amplitud de la ventana, entre otros) y cuantificación

(ión cuantificador, intensidad del ión cuantificador, amplitud de la ventana de integración y búsqueda, entre otros).

Tabla 13. Iones precursores e iones producto de los compuestos monitoreados

Pesticida	Segmento	Duración del segmento (min)		Ión precursor, m/z	Iones producto, m/z (V) ^c
		STA ^a	STB ^b		
Metamidofos	1	4.62–6.51	3.12–5.91	141	64 (-15), 79 (-15), 94 (-15)
Tetrahidroftalimida ^d	2	6.51–9.50	5.91–7.25	151	79 (-10), 122 (-10), 136 (-5)
Carbofurán	3	---	7.25–8.81	221	122 (-5), 149 (-10), 164 (-10)
Cafeína	4	9.50–11.01	8.82–9.61	194	109 (-15), 120 (-10), 137 (-5)
Malatión	5	11.01–11.55	9.62–10.36	173	99 (-15), 127 (-10), 145 (-5)
alfa-Endosulfán	6	12.10–12.85	10.36–12.85	241	133 (-5), 136 (-5), 170 (-10), 206 (-5), 241 (-10)

a. Soluciones de trabajo con concentraciones: 1.0, 5.0 y 10 ppm de cada pesticida y 2.0 ppm de cafeína.

b. Soluciones de trabajo con concentraciones: 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm de cada pesticida y 0.5 ppm de cafeína.

c. Energía de colisión en V.

d. Producto de degradación del captan.

En las Tablas 14 y 15, se muestran los resultados del re-cálculo y la ecuación de la curva de calibración para cada uno de los pesticidas a partir de STA y STB, respectivamente. Se observan también los tiempos de retención, el ión cuantificador y el ión o iones calificadores elegidos de los iones producto de cada compuesto y el área del pico del ión cuantificador; se indica la ventana de búsqueda y la ventana de integración.

Tabla 14. Resultados para soluciones de trabajo STA (1.0, 5.0 y 10 ppm y 2.0 ppm cafeína)

Parámetro	Compuesto				
	Cafeína	Metamidofos	(THFI)*	Malatión	alfa-Endosulfán
Ventana de búsqueda (min)	10.37–10.77	5.32–5.72	7.94–8.34	11.09–11.49	12.18–12.58
Ventana de integración (min)	10.32–10.82	5.27–5.77	7.89–8.39	11.04–11.54	12.12–12.62
Tiempo de retención (min)	10.57 ± 0.20	5.52 ± 0.20	8.14 ± 0.20	11.29 ± 0.20	12.37 ± 0.20
Ión(es) calificador(es), m/z (% incertidumbre) ^a	137 (18.2)	79 (83.5) 64 (29.9)	136 (8.1)	127 (22.9)	136 (0.7)
Ión cuantificador	109	94	79	99	170
Área	159 941	14 113	34 078	118 244	792
Ecuación de calibración	-	$y = 0.03 x^2 + 0.17 x - 0.02$	$y = 0.04 x^2 + 0.24 x + 0.09$	$y = 0.15 x^2 + 1.13 x + 0.15$	$y = 1.09 e^{-4} x^2 + 0.01 x$
R ²	-	0.999	1.0	0.999	1.0

* Tetrahidroftalimida (producto de degradación del captan).

a. Con 30% de incertidumbre, los intervalos fueron: 137 m/z: (0.1–41.7)%; 79 m/z: (59.9–119.9)%, 64 m/z: (0.1–55.8)%; 136 m/z: (0.1–32.6)%; 127 m/z: (0.1–60.5)%; 136 m/z: (0.1–30.7)%.

Además, en las Tablas 14 y 15, se mencionan los iones cuantificadores y calificadores, éstos son los iones producto de cada compuesto. El ión cuantificador fue el de mayor abundancia relativa en el cromatograma y espectro de masa/masa correspondiente del pesticida y del estándar interno. La abundancia relativa del ión cuantificador de cada compuesto en el espectro de masa/masa fue de 100%. Mientras que los iones calificadores presentaron abundancias relativas de 5 a 85%.

También, en la Tabla 14, se observa que para el metamidofos se identificaron dos iones calificadores además del ión cuantificador. Para la cafeína, la tetrahydroftalimida (THFI), el malatión y el alfa-endosulfán, se identificó un ión calificador además del ión cuantificador. Además, en la Tabla 15, se muestra que para la cafeína, el carbofurán y el malatión se identificó un ión calificador, además del cuantificador, y para el metamidofos, la THFI y el alfa-endosulfán se identificaron dos iones calificadores.

En estudios de identificación y cuantificación de residuos de pesticidas realizados mediante espectrometría de masa/masa, es necesario identificar al menos un ión calificador además del ión cuantificador. Es decir, con la detección de dos iones producto (un ión cuantificador y un calificador), es posible confirmar la presencia del pesticida y cuantificarlo (Fernández-Moreno, J. L. *et al.*, 2008).

Tabla 15. Resultados para soluciones de trabajo STB (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm y 0.5 ppm cafeína)

Parámetro	Compuesto					
	Cafeína	Metamido- fos	(THFI)*	Carbofurán	Malatión	alfa- Endosulfán
Ventana de búsqueda (min)	8.73–9.13	3.92–4.32	5.89–6.29	7.84–8.24	9.54–9.94	10.72–11.12
Ventana de integración (min)	8.68–9.18	3.87–4.37	5.84–6.34	7.79–8.29	9.49–9.99	10.58–11.28
Tiempo de retención (min)	8.93 ± 0.20	4.12 ± 0.20	6.09 ± 0.20	8.04 ± 0.20	9.74 ± 0.20	10.93 ± 0.20
Ión(es) calificador(es), m/z (% incertidumbre) ^a	137 (38.5)	79 (5.4) 64 (40.9)	122 (30.6) 136 (12.7)	149 (30.6)	127 (61.4)	133 (44.6) 241 (22.9)
Ión cuantificador	109	94	79	164	99	206
Área	6 825	1 764	3 126	669	9 686	611
Ecuación de calibración	-	y = 0.049 x ² - 0.28 x + 0.49	y = 0.25 x ² - 0.99 x + 1.20	y = 0.004 x ² + 0.13 x - 0.03	y = - 0.41 x ² + 3.40 x - 1.56	y = 0.03 x ² - 0.13 x + 0.18
R ²	-	0.896	0.999	0.996	0.994	0.936

* Tetrahydroftalimida (producto de degradación del captan).

a. Con 30% de incertidumbre, los intervalos fueron: 137 m/z: (13.2–53.2)%; 79 m/z: (4.8–136.8)%, 64 m/z: (30.0–70.0)%, 122 m/z: (20.8–60.8), 136 m/z: (0.1–32.6)%; 149 (2.2–42.2)%; 127 m/z: (0.1–62.0)%; 133 m/z: (0.1–47.4)%, 241 m/z: (0.1–32.3)%.

Al emplear los datos de calibración resultado del análisis de las soluciones patrón, se realizó la identificación y cuantificación inequívoca de cada pesticida en los vegetales estudiados.

En el Apéndice 1 se presentan los cromatogramas y espectros de masa del ión cuantificador y los iones calificadores obtenidos del experimento MS/MS para cada compuesto en la solución de trabajo de 1.0 ppm de pesticidas con 2.0 ppm del estándar interno (cafeína). Así como, para la solución de trabajo de 0.5 ppm de pesticidas con 0.5 ppm de cafeína, respectivamente.

Cabe mencionar que para los vegetales analizados con los métodos contruidos a partir de las soluciones de trabajo de 1.0, 5.0 y 10 ppm con 2.0 ppm de cafeína (STA), se hizo una sola inyección. En los métodos contruidos a partir de las soluciones de trabajo de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm con 0.5 ppm de cafeína (STB), se hicieron tres inyecciones, monitoreando los dos o tres iones producto seleccionados para cada compuesto. Cada pesticida fue confirmado en base a un porcentaje de incertidumbre dentro del intervalo establecido para cada ión calificador en las soluciones de trabajo. En este caso, las muestras fueron marcadas como no negativas y fueron cuantificadas. Para realizar la cuantificación, se eligió aquel ión producto más intenso, éste no correspondió a ninguno de los iones calificadores.

3.7. Criterios de calidad interna

Para asegurar la calidad de los resultados de la metodología propuesta, se establecieron algunos criterios de calidad interna, además del estándar interno, se consideraron: coeficientes de variación, límite de detección (LDD) y límite de cuantificación (LDC). En este trabajo, como estándar interno se empleó cafeína.

Los posibles cambios en los tiempos de retención, intensidad, área y abundancia de los iones producto se consideraron al utilizar el estándar interno. Se relacionaron las respuestas instrumentales de cada pesticida con la del estándar interno. Específicamente, se utilizó la relación de áreas del ión cuantificador asignado a cada pesticida y el área del ión cuantificador del estándar interno (109 m/z), es decir, se utilizó la respuesta

instrumental relativa del ión cuantificador correspondiente, respecto al estándar interno, Ecuación 1.

$$RA = \frac{A_1}{A_2} \quad \text{Ecuación (1)}$$

Donde,
 RA: relación de áreas
 A₁: área del ión cuantificador del pesticida
 A₂: área del ión cuantificador del estándar interno (109 m/z)

Los coeficientes de variación se calcularon para los extractos obtenidos y para el análisis en el equipo de GC-MS/MS. La ecuación 2 se empleó para calcular el coeficiente de variación de los resultados obtenidos.

$$CV = \left(\frac{S}{\bar{x}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación (2)}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Ecuación (3)}$$

donde:
 CV: Coeficiente de variación
 S: desviación estándar
 x: valor de la réplica
 \bar{x} : promedio
 n: número total de réplicas

El LDD es la menor concentración que se puede detectar con el método de análisis propuesto, generalmente se considera una relación S/R mayor a 3. El LDC se determinó como la concentración más baja inyectada que generalmente proporciona una relación S/R de 10.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Los vegetales muestreados para la realización de este trabajo fueron calabacita, *Cucurbita pepo* (CAL), tomate verde, *Physalis ixocarpa* (TV) y jitomate saladette, *Lycopersicum esculentum* (JSA, JSB y JSO). Estos vegetales se analizaron mediante un método multi-residuos de pesticidas para identificar y cuantificar captan, carbofurán, alfa-endosulfán, malatión y metamidofos. Primero se efectuó una extracción sólido-líquido con acetato de etilo como disolvente y posteriormente, se realizó el análisis en el equipo de GC-MS/MS.

Los resultados obtenidos de la extracción, identificación y cuantificación de los pesticidas mencionados, se describen y analizan a continuación.

4.1. Extracción sólido-líquido de pesticidas en los vegetales estudiados

En los cultivos de vegetales de la región Mixteca son aplicados una gran variedad de pesticidas. Por ello, el presente estudio se limitó a pesticidas reportados por la Brigada de Promoción del Desarrollo de la Universidad Tecnológica de la Mixteca. La información recabada guió a la búsqueda de residuos de captan, carbofurán, endosulfán, malatión y metamidofos en calabacita, tomate verde y jitomate saladette.

El uso de la técnica de extracción sólido-líquido, nos permitió analizar muestras de tamaño pequeño (5 g aproximadamente), obtener el extracto para el análisis en el equipo de GC-MS/MS en tiempos relativamente cortos (60 minutos por réplica) y evitar pasos de limpieza. Además el acetato de etilo, tiene la capacidad de extracción adecuada para un amplio intervalo de pesticidas, provee buenas recuperaciones de pesticidas con propiedades diferentes y es un disolvente menos dañino que los disolventes clorados (Garrido-Frenich, A. *et al.*, 2005; Martínez-Vidal, J. L. *et al.*, 2006).

Los resultados de la extracción sólido-líquido de los vegetales se muestran en la Tabla 16, en ésta se menciona el número de réplicas realizadas, así como los porcentajes de

extracción. Los porcentajes de extracción fueron diferentes para cada vegetal, probablemente se debe a las diferencias en la composición de la matriz vegetal.

Tabla 16. Porcentajes de extracción con acetato de etilo de los vegetales estudiados*

<i>Vegetal</i>	<i>Clave</i>	<i>Porcentaje de extracción (%)</i>	<i>Coefficiente de variación (%)</i>
Calabacita	CAL	0.1305 ± 0.004	2.90
Tomate verde	TV	0.1312 ± 0.003	2.22
Jitomate saladette A	JSA	0.1172 ± 0.003	2.81
Jitomate saladette B	JSB	0.1532 ± 0.002	1.08
Jitomate saladette orgánico	JSO	0.1351 ± 0.003	2.54

* 10 réplicas para cada vegetal.

El coeficiente de variación muestral es menor a 5%, lo que significa que la técnica de extracción realizada a los vegetales fue sistemática y se reprodujo entre réplicas (Waliszewski, S. M. *et al.*, 2004).

4.2. Análisis del estándar interno y de los pesticidas en los vegetales estudiados

Los análisis de pesticidas en los vegetales estudiados se realizaron bajo las condiciones de operación establecidas en el sistema de GC-MS/MS-QqQ junto con los métodos de identificación y cuantificación.

Es importante mencionar que la identificación y cuantificación de los iones producto de metamidofos, se realizó bajo impacto electrónico con concentraciones en las soluciones de trabajo de 5.0, 10 y 40 ppm. Sin embargo, a concentraciones menores (0.5 a 2.0 ppm) sólo se realizó la identificación. Esto se debe a la baja estabilidad y rápida degradación del compuesto a temperaturas altas (por arriba de 180°C) y al exceso de energía de la fragmentación por EI (NIOSH, 2009). Por lo que a bajas concentraciones de metamidofos, se recomienda realizar la fragmentación con ionización química (CI).

Además, en el análisis de las soluciones de trabajo recién preparadas, captan y malatión tenían un tiempo de retención similar, esto originó que los picos aparecieran muy cercanos en el cromatograma. Cuando se realizó el análisis de soluciones de trabajo que tenían entre 24 y 48 horas de almacenamiento, la intensidad, relación S/R y área del pico

del captan se vio disminuida. Finalmente, en los análisis de soluciones de trabajo con más de 48 horas de almacenamiento a 4°C, no se detectaron los iones producto del captan; y por lo tanto el segmento correspondiente se excluyó. Sin embargo, se logró identificar a uno de los dos productos de descomposición del captan, la THFI.

La descomposición del captan se favorece por efecto del calentamiento, evaporación, hidrólisis, pHs ácidos y exposición al sol (Bescos, D. *et al.*, 1995; Angioni, A. *et al.*, 2003), formándose de manera mayoritaria THFI (96.5%), Figura 10.

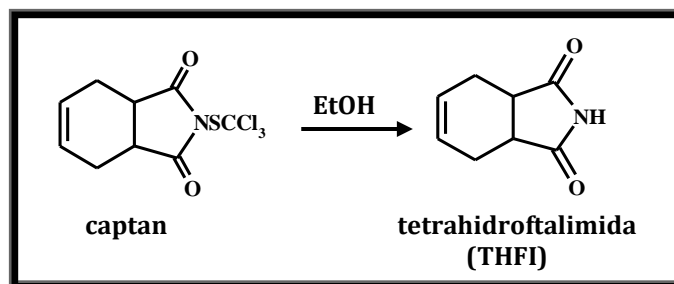


Figura 10. Degradación del captan a tetrahidroftalimida (THFI)

En este estudio, la transformación química del captan pudo favorecerse por la presencia de etanol y al pH de la solución de trabajo y de las muestras de vegetales. El compuesto de degradación THFI tiene una polaridad mayor que el captan por lo que el compuesto tuvo menos afinidad hacia la columna capilar, reteniéndose por menos tiempo.

Empleando los métodos de identificación y cuantificación establecidos para cada curva de calibración (STA y STB), se realizó el análisis de pesticidas en los vegetales estudiados. En tomate verde, jitomate saladette A y B se identificaron inequívocamente metamidofos, malatión y alfa-endosulfán. La cuantificación de metamidofos en tomate verde y jitomate saladette A, se realizó utilizando la curva de calibración STA y se emplearon 15 g de muestra, Tabla 17.

La curva de calibración STB se utilizó para la identificación de THFI, malatión y alfa-endosulfán, así como para la cuantificación de THFI en jitomate saladette A, malatión en todas las muestras de vegetales estudiadas, y alfa-endosulfán en jitomate saladette B. Cabe señalar que no se identificó carbofurán en las muestras estudiadas.

Tabla 17. Cantidad de muestra vegetal utilizada para el análisis

<i>Vegetal</i>	<i>Muestra (g)</i>	
	<i>STA^a</i>	<i>STB^b</i>
Calabacita	15.07	15.08
Tomate verde	15.07	15.06
Jitomate saladette A	15.07	15.07
Jitomate saladette B	5.03	15.08
Jitomate saladette orgánico	5.02	15.08

a. Soluciones de trabajo de 1.0, 5.0 y 10 ppm con 2 ppm de cafeína. Cada réplica se diluyó con 200 μ L de etanol que contenía 2 ppm de cafeína.

b. Soluciones de trabajo de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm con 0.5 ppm de cafeína. Cada réplica se diluyó con 200 μ L de etanol que contenía 0.5 ppm de cafeína.

A continuación se muestran los resultados de los análisis realizados a cada vegetal. También, se hace un análisis comparativo de las concentraciones de pesticidas encontradas en cada vegetal estudiado con los límites máximos residuales (LMRs), establecidos por la CE (Directiva 91/414/ECC).

4.2.1. Análisis del estándar interno (cafeína). El estándar interno permitió realizar la cuantificación de los pesticidas. La cuantificación se realizó empleando la relación de áreas de los picos cuantificadores de cada pesticida con el área del ión cuantificador del estándar interno (109 m/z).

Los iones producto del estándar interno (109 y 137 m/z) tuvieron un comportamiento distinto en cada vegetal. En la Tabla 18, se muestran las áreas, porcentajes de incertidumbre y tiempos de retención de los iones producto del estándar interno (109 y 137 m/z) en cada vegetal. Además, se observa que en la curva de calibración STA, el porcentaje de incertidumbre más bajo para el ión calificador (137 m/z) fue 20.5% en el jitomate saladette A y el más alto de 32.7% en el jitomate saladette B. Además, en todos los vegetales, el ión cuantificador (109 m/z), tuvo un área por encima del valor mínimo de abundancia requerido (500).

Asimismo, en la Tabla 18, se observa que para la curva de calibración STB, el ión calificador (137 m/z) tuvo porcentajes de incertidumbre entre 18.6-50.6 %, el porcentaje más bajo corresponde a la calabacita y el más alto al jitomate saladette orgánico. En todos los vegetales, el ión cuantificador (109 m/z) tuvo áreas por encima del valor mínimo de abundancia requerido (500).

Tabla 18. Características del ión cuantificador y calificador de la cafeína en los vegetales estudiados

Parámetro	STA*					STB**				
	CAL ^a	TV ^b	JSA ^c	JSB ^d	JSO ^e	CAL ^a	TV ^b	JSA ^c	JSB ^d	JSO ^e
Tiempo de retención (min)	10.51	10.52	10.56	10.58	10.55	8.88	8.90	8.92	8.95	8.94
Ión calificador (137 <i>m/z</i>) (% incertidumbre) ^f	24.5	23.6	20.5	32.7	22.0	18.6	22.2	26.8	25.4	50.6
Área del ión cuantificador (109 <i>m/z</i>) ^g	190 514	229 184	179 322	13 272	185 025	13 684	58 761	25 852	11 054	11 543

* Soluciones de trabajo de 1.0, 5.0 y 10 ppm con 2 ppm de cafeína. Cada réplica se diluyó con 200 µL de etanol que contenía 2 ppm de cafeína.

** Soluciones de trabajo de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm con 0.5 ppm de cafeína. Cada réplica se diluyó con 200 µL de etanol que contenía 0.5 ppm de cafeína.

a. Calabacita.

b. Tomate verde.

c. Jitomate saladette A.

d. Jitomate saladette B.

e. Jitomate saladette orgánico.

f. Intervalo de confianza para STA: (0.1–41.7)%, y para STB: (13.2–53.2)%.

g. Área requerida: >= 500.

4.2.2. Análisis de pesticidas en calabacita *Cucurbita pepo* (CAL). El uso de la curva de calibración STA para el análisis de calabacita permitió la identificación del malatión. La identificación de este pesticida se realizó debido a que en la ventana de búsqueda se observaron los iones producto 99 y 127 *m/z* con un tiempo de retención de 11.22 ± 0.01 minutos, Tabla 19.

Tabla 19. Características de los pesticidas determinados en calabacita (CAL) con la curva de calibración STA^a

Parámetro	Compuesto
	Malatión ^b
Tiempo de retención (min)	11.22 ± 0.01
Ión(es) calificador(es), <i>m/z</i> (% incertidumbre)	127 (34.0)
Ión cuantificador, <i>m/z</i>	99
Área	2 407 ± 207.9
Relación de áreas (requerida)	0.01 (0.15)

a. Soluciones de trabajo de 1.0, 5.0 y 10 ppm con 2.0 ppm de cafeína.

b. Intervalo de confianza: 127 *m/z* (0.1-60.5)%.

La THFI y el pesticida alfa-endosulfán, no se detectaron. Eso se debió probablemente a que a esas concentraciones las energías de colisión seleccionadas no fueron las adecuadas.

Cuando se utilizó la curva de calibración STB, además del malatión, se identificaron la THFI y el alfa-endosulfán. Esta curva de calibración también permitió cuantificar al malatión. En la Tabla 20 se observan los promedios y desviaciones estándar de los tiempos de retención y áreas, así como las características de los iones producto de cada compuesto.

Tabla 20. Características de los pesticidas determinados en calabacita (CAL) con la curva de calibración STB^a

<i>Parámetro</i>	<i>Compuesto</i>		
	<i>Tetrahidroftalimida (THFI)^a</i>	<i>Malatión^b</i>	<i>alfa-Endosulfán^c</i>
Tiempo de retención (min)	6.09 ± 0.12	9.76 ± 0.07	10.89 ± 0.04
Ión(es) calificador(es), <i>m/z</i> (% incertidumbre)	122 (18.4) 136 (17.3)	127 (34.0)	133 (132.0) 241 (313.0)
Ión cuantificador, <i>m/z</i>	79	99	206
Área	662.5 ± 71.4	579 ± 21.2	122 ± 41
Relación de áreas (requerido)	0.04 (0.22)	0.03 (0.03)	0.01 (0.05)

a. Soluciones de trabajo de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm con 0.5 ppm de cafeína.

b. Intervalo de confianza: 122 *m/z* (20.8-60.8)%, 136 *m/z* (0.1-32.6)%.

c. Intervalo de confianza: 127 *m/z* (0.1-62.0)%.

d. Intervalo de confianza: 133 *m/z* (0.1-47.4)%, 241 *m/z* (0.1-32.3)%.

Para la cuantificación del malatión, se identificaron dos iones producto (99 y 127 *m/z*) en la ventana de búsqueda a los 9.76 ± 0.07 minutos, el ión calificador (127 *m/z*) se identificó con 34.0% de incertidumbre (0.1–62.0%). El ión cuantificador 99 *m/z* tuvo una relación de áreas de 0.03 adecuada para el análisis cuantitativo (relación ≥ 0.03).

En el caso de la THFI, los iones producto (79, 122 y 136 *m/z*), se detectaron en la ventana de búsqueda al minuto 6.09 ± 0.12, (Apéndice 2) y permitieron la identificación del compuesto y por la tanto la presencia del captan de forma indirecta.

También, se identificó al alfa-endosulfán, se revisó el segmento de tiempo correspondiente a la ventana de búsqueda, encontrándose los 3 iones producto (133, 206 y 241 m/z) a 10.89 ± 0.04 minutos, Tabla 20.

Con los resultados anteriores, se determinó que los pesticidas presentes en calabacita fueron THFI, malatión y alfa-endosulfán. La curva de calibración STB (0.5-2.0 ppm) permitió cuantificar malatión.

Los residuos de malatión (0.51 ± 0.01 mg/kg) cuantificados representan 25.5 veces el LMR (0.02 mg/kg), Figura 11.

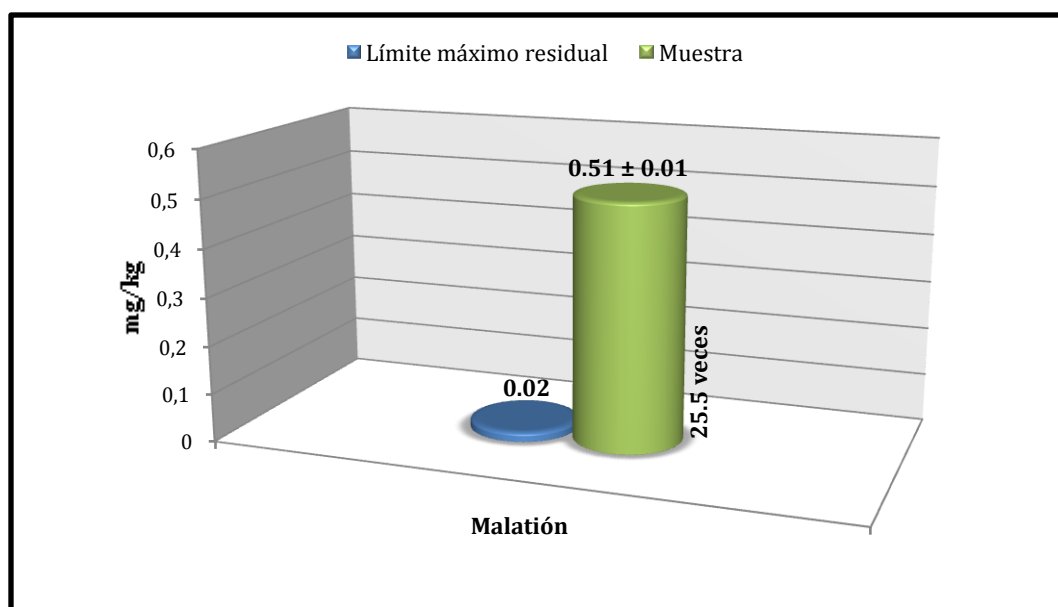


Figura 11. Pesticidas identificados y cuantificados en calabacita (CAL)* comparados con LMRs

*Se identificó THFI y alfa-endosulfán

Como se mencionó anteriormente, el malatión es un pesticida organofosforado ampliamente usado debido a su bajo costo y elevada efectividad. Para calabacita, el LMR de malatión (0.02 mg/kg) es más bajo que el asignado a tomate verde y jitomate saladette (0.5 mg/kg), esto probablemente se deba a que el cultivo de este vegetal requiere menor cantidad de malatión.

Es importante resaltar que no existen reportes previos relacionados con el análisis de los pesticidas estudiados en el presente trabajo en calabacita.

4.2.3. Análisis de pesticidas en tomate verde *Physalis ixocarpa* (TV). El análisis realizado al tomate verde con la curva de calibración STA permitió la identificación de metamidofos y malatión, y la cuantificación de metamidofos. En la Tabla 21 se muestran los resultados del análisis y los parámetros considerados para llevar a cabo la cuantificación.

Tabla 21. Características de los pesticidas determinados en tomate verde (TV) con la curva de calibración STA^a

<i>Parámetro</i>	<i>Compuesto</i>	
	<i>Metamidofos^b</i>	<i>Malatión^c</i>
Tiempo de retención (min)	5.53	11.23
Ión(es) calificador(es), <i>m/z</i> (% incertidumbre)	79 (92.9) 64 (49.0)	127 (47.6)
Ión cuantificador, <i>m/z</i>	94	99
Área	1 336	20 649
Relación de áreas (requerido)	0.006 (0.003)	0.09 (0.15)

a. Soluciones de trabajo de 1.0, 5.0 y 10 ppm con 2.0 ppm de cafeína.

b. Intervalo de confianza: 79 *m/z* (59.9-119.9)%, 64 *m/z* (0.1-55.8)%.

c. Intervalo de confianza: 127 *m/z* (0.1-60.5)%.

En la ventana de búsqueda asignada al metamidofos, se detectaron tres iones producto (64, 79 y 94 *m/z*) a 5.53 minutos, Apéndice 2. Los iones designados como calificadores, 64 y 79 *m/z* tuvieron 49 y 92.9% de incertidumbre, valores dentro del intervalo de confianza (0.1-55.8% y 59.9-119.9%). El ión cuantificador (94 *m/z*) presentó un área de 1 336, mayor a la mínima requerida (300) y relación de áreas (0.006) fue válida para la curva de calibración (relación mínima ≥ 0.003).

Para el malatión, los iones producto 99 y 127 *m/z* tuvieron un tiempo de retención de 11.23 minutos en la ventana de búsqueda, lo que permitió la identificación del pesticida.

En las correspondientes ventanas de búsqueda, no se identificaron los iones producto para THFI y alfa-endosulfán.

La curva de calibración STB permitió identificar a la THFI y cuantificar al malatión, además de los ya identificados (metamidofos y malatión) con la curva de calibración STA. En la Tabla 22 se observan los promedios, desviaciones estándar y las características de los iones producto.

La cuantificación del malatión, se hizo con los iones producto (99 y 127 m/z) a un tiempo de retención de 9.79 ± 0.02 minutos. El ión calificador (127 m/z) tuvo 33.7% de incertidumbre, que se encontró dentro del intervalo de confianza (0.1–60.5%). El área del ión cuantificador (99 m/z) fue de 25 735, éste valor estuvo por encima del valor establecido (200) y la relación de áreas (0.10) fue adecuada para la curva de calibración (relación mínima ≥ 0.03).

Tabla 22. Características de los pesticidas determinados en tomate verde (TV) con la curva de calibración STB^a

Parámetro	Compuesto		
	Metamidofos ^b	Tetrahidroftalimida (THFI) ^c	Malatión ^d
Tiempo de retención (min)	4.15	6.06 \pm 0.14	9.70 \pm 0.02
Ión(es) calificador(es), m/z (% incertidumbre)	---	122 (53.0) 136 (22.4)	127 (33.7)
Ión cuantificador, m/z	94	79	99
Área	514	1 031 \pm 149	25 735 \pm 4093
Relación de áreas (requerida)	0.009 (0.1)	0.03 (0.22)	0.10 (0.03)

a. Soluciones de trabajo de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm con 0.5 ppm de cafeína.

b. Intervalo de confianza: 79 m/z (4.8-136.8)%, 64 m/z (30.0-70.0)%.

c. Intervalo de confianza: 122 m/z (20.8-60.8)%, 136 m/z (0.1-32.6)%.

d. Intervalo de confianza: 127 m/z (0.1-62.0)%.

Además, se identificó THFI, a partir de los tres iones producto (79, 122 y 136 m/z) a 6.06 \pm 0.14 minutos. En el caso del metamidofos, se observaron los iones producto 79 y 94 m/z a 4.15 minutos, lo que permitió su identificación, Tabla 22. No se identificó alfa-endosulfán.

Del análisis de pesticidas realizado al tomate verde (TV) se puede afirmar que contiene residuos de metamidofos, THFI y malatión. Las concentraciones de metamidofos y malatión empleando las curvas de calibración STA y STB, se muestran en la Figura 12.

La concentración de metamidofos en la muestra de tomate verde fue de 0.15 mg/kg, la cual representa 15 veces el LMR establecido para ese pesticida (0.01 mg/kg). Respecto al malatión, la concentración en este vegetal fue de 0.64 mg/kg, y representa 1.3 veces el LMR (0.5 mg/kg), Figura 12.

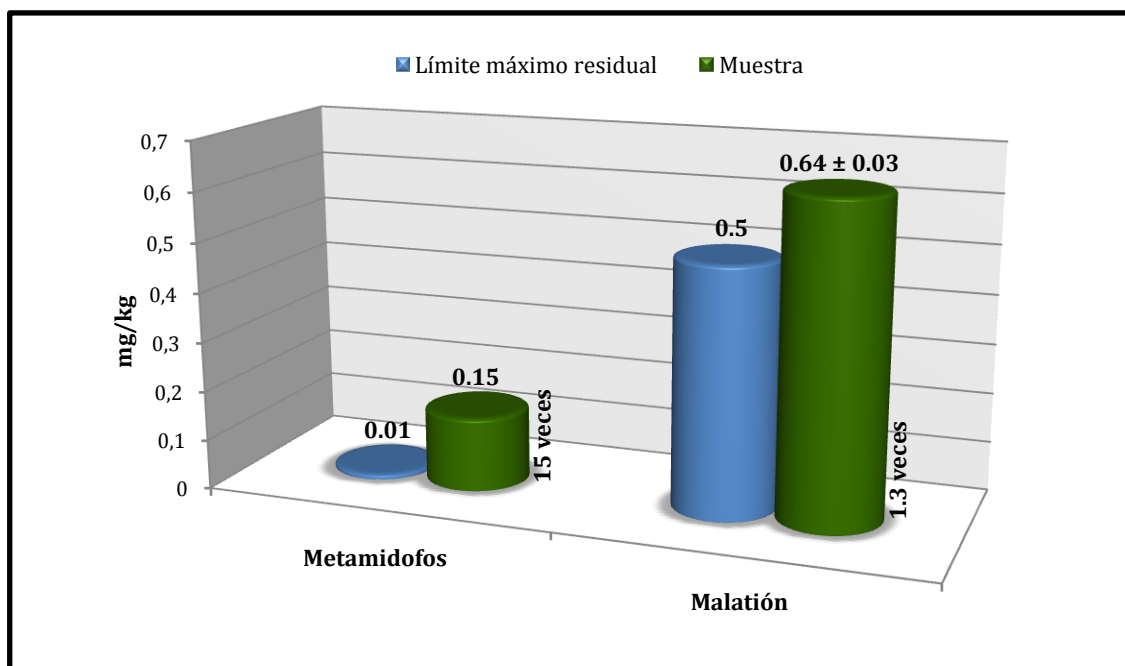


Figura 12. Pesticidas identificados y cuantificados en tomate verde (TV)* comparados con LMRs

*Se identificó THFI.

No se encontraron análisis de este vegetal reportados en bibliografía por lo que no se compara con otros estudios.

4.2.4. Jitomate saladette (*Lycopersicum esculentum*) A, B y orgánico (JSA, JSB y JSO). El empleo de la curva de calibración STA en JSA permitió la identificación de metamidofos y malatión, asimismo en JSB de metamidofos y alfa-endosulfán. Además, se realizó la cuantificación de metamidofos en JSA y JSB.

En la Tabla 23, se muestran los resultados del análisis de JSA para el metamidofos. Para este pesticida, se detectaron tres iones producto (64, 79 y 94 m/z) a los 5.57 minutos, la cuantificación se realizó debido a que la relación de áreas (0.006) fue adecuada para la

cuantificación (relación ≥ 0.003). También se observa que en el análisis de JSB para el metamidofos, se detectaron los iones producto 79 y 94 m/z a los 5.37 minutos. La relación de áreas (0.06) estuvo dentro de la curva de calibración (relación ≥ 0.003), por lo tanto, se llevó a cabo la cuantificación.

En el análisis de JSA, para el caso del malatión (Apéndice 2), se encontraron los iones producto 99 y 127 m/z a los 11.23 minutos, por lo que se realizó la identificación de este pesticida, Tabla 23.

Tabla 23. Características de los pesticidas determinados en jitomate saladette A y B (JSA y JSB) con la curva de calibración STA^a

Parámetro	Compuesto			
	Metamidofos ^b		Malatión ^c	alfa-Endosulfán
	JSA ^d	JSB ^e	JSA ^d	JSB ^e
Tiempo de retención (min)	5.57	5.37	11.23	12.34
Ión(es) calificador(es), m/z (% incertidumbre)	79 (55.1) 64 (43.0)	79 (5.3) ---	127 (135.6)	---
Ión cuantificador, m/z		94	99	170
Área	1 151	732	2 589	773
Relación de áreas (requerida)	0.006 (0.003)	0.06(0.003)	0.01 (0.15)	0.06 (0.002)

a. Soluciones de trabajo de 1.0, 5.0 y 10 ppm con 2.0 ppm de cafeína.

b. Intervalo de confianza: 79 m/z (59.9-119.9)%, 64 m/z (0.1-55.8)%.

c. Intervalo de confianza: 127 m/z (0.1-60.5)%.

d. Jitomate saladette A.

e. Jitomate saladette B.

Para la muestra JSB, en la ventana de búsqueda del alfa-endosulfán se presentó el ión producto 170 m/z a los 12.34 minutos. No se detectó ningún ión calificador, por lo que el resultado se consideró como negativo y no se realizó la cuantificación.

Tanto para JSA y JSB no se identificó la THFI. Además en el caso de JSA tampoco se identificó al alfa-endosulfán y en JSB al malatión.

En el análisis de JSA, al utilizar la curva de calibración STB, se identificó y cuantificó THFI y malatión. En JSB, esta curva permitió la identificación de THFI y la cuantificación de malatión y alfa-endosulfán. Además, en JSO se identificó THFI, malatión y alfa-endosulfán, y se cuantificó malatión, Tabla 24.

Para el caso de JSA, en la ventana de búsqueda correspondiente a la THFI, se detectaron los iones 79, 122 y 136 m/z a los 6.05 ± 0.01 minutos. Se obtuvo una relación de áreas de 0.32, válida para la curva de calibración (relación ≥ 0.22). En JSB y JSO se identificó THFI, los iones 79, 122 y 136 m/z se detectaron a los 6.13 ± 0.08 minutos en JSB y a los 6.08 ± 0.02 minutos en JSO, Tabla 24.

En los tres jitomates, el malatión fue identificado y cuantificado. El tiempo de retención de los iones 99 y 127 m/z (ión calificador) varió de 9.73 a 9.77 minutos. La relación de áreas estuvo entre 0.07 y 0.83, válidas para la curva de calibración (relación ≥ 0.03).

En las muestras de JSB y JSO se identificó alfa-endosulfán, pero sólo en JSB pudo cuantificarse, en este vegetal, el tiempo de retención de los iones producto (133, 206 y 241 m/z) fue de 10.91 ± 0.07 minutos. La relación de áreas fue de 0.12, valor adecuado para la curva de calibración (relación ≥ 0.05), Apéndice 2 y Figura 13.

Como se mencionó anteriormente, en el JSA y JSB se detectaron residuos de metamidofos (0.15 y 0.42 mg/kg, respectivamente), ambos por encima del LMR establecido (0.01 mg/kg). La concentración en JSB es 42 veces el LMR, y además es 2.8 veces mayor que la cuantificada en JSA, Figura 13.

Aunque la THFI fue identificada en los tres jitomates, sólo pudo cuantificarse en JSA. La THFI, es el compuesto de degradación del captan y tiene efectos tóxicos similares. La THFI no aparece en el listado publicado por la CE, sin embargo, la comunidad recomienda emplear el LMR mínimo establecido para pesticidas en vegetales (0.01 mg/kg). Los residuos de THFI cuantificados se compararon con este LMR (Fernández-Moreno, J. L. *et al.*, 2008).

Tabla 24. Características de los pesticidas determinados en jitomate saladette A, B y orgánico (JSA, JSB y JSO) con la curva de calibración STB^a

Parámetro	Tetrahidroftalimida (THFI) ^b			Malatión ^c			alfa-Endosulfán ^d	
	JSA ^e	JSB ^f	JSO ^g	JSA ^e	JSB ^f	JSO ^g	JSB ^f	JSO ^g
Tiempo de retención (min)	6.05 ± 0.01	6.13 ± 0.08	6.08 ± 0.02	9.73	9.77 ± 0.02	9.75 ± 0.02	10.91 ± 0.07	10.90 ± 0.04
Ión(es) calificador(es), <i>m/z</i> (% incertidumbre)	122 (45.3)	122 (32.8)	122 (57.6)	127 (0.2)	127 (23.3)	127 (16.0)	133 (2.4)	133 (2.4)
	136 (14.6)	136 (8.7)	136 (18.6)				241 (23.8)	241 (23.8)
Ión cuantificador, <i>m/z</i>		79			99		206	
Área	1 031 ± 149	886 ± 59	708 ± 112	1 507	1 986 ± 750	12 963 ± 2412	1 343 ± 41	157 ± 42
Relación de áreas (requerida)	0.32 (0.22)	0.09 (0.22)	0.09 (0.22)	0.07 (0.03)	0.26 (0.03)	0.83 (0.03)	0.12 (0.05)	0.02 (0.05)

a. Soluciones de trabajo de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm con 0.5 ppm de cafeína.

b. Intervalo de confianza: 122 *m/z* (20.8-60.8)%, 136 *m/z* (0.1-32.6)%.

c. Intervalo de confianza: 127 *m/z* (0.1-62.0)%.

d. Intervalo de confianza: 133 *m/z* (0.1-47.4)%, 241 *m/z*: (0.1-32.3)%.

e. Jitomate saladette A.

f. Jitomate saladette B.

g. Jitomate saladette orgánico.

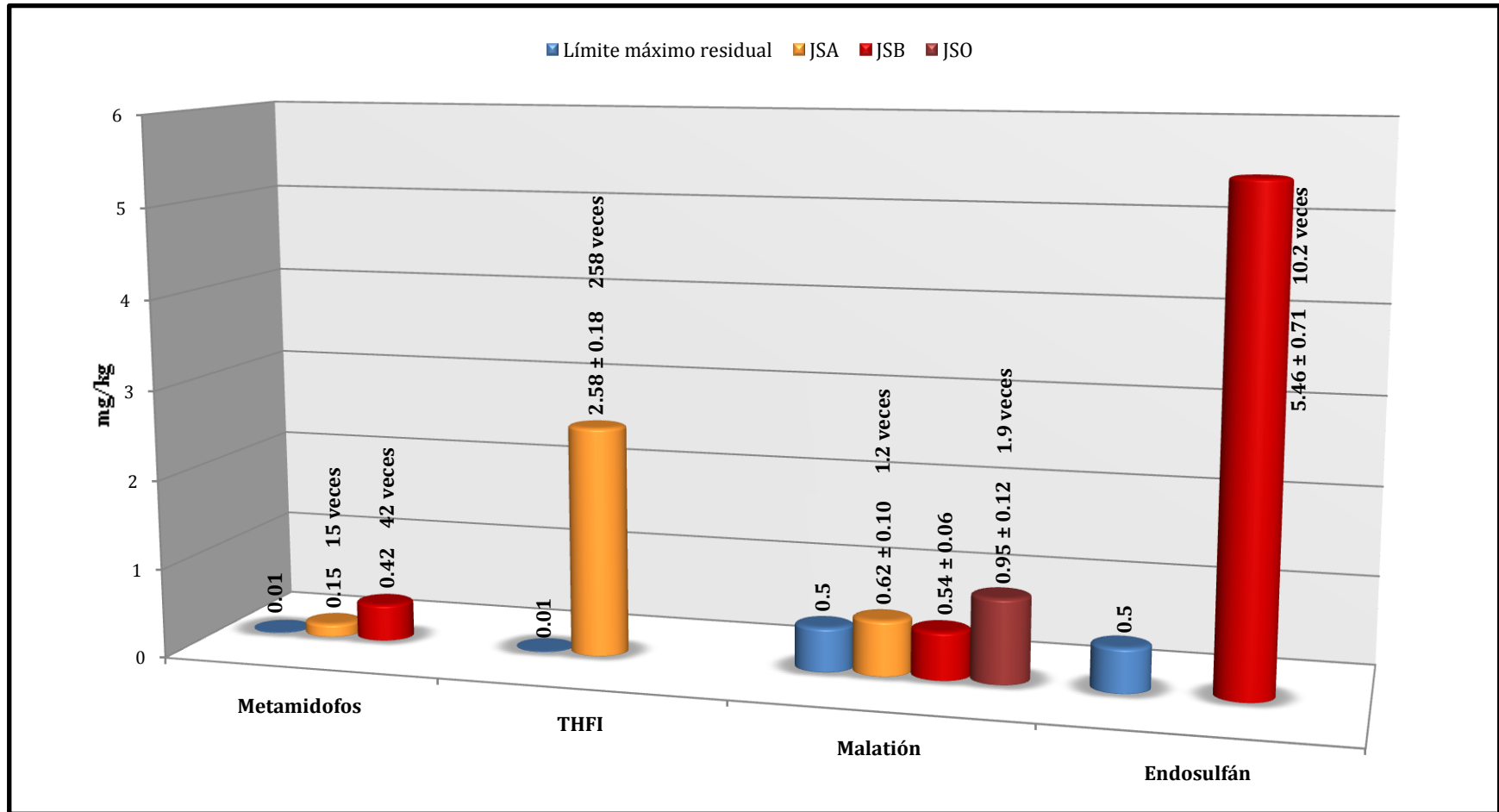


Figura 13. Pesticidas identificados y cuantificados en jitomate saladette A (JSA)*, jitomate saladette B (JSB)* y orgánico y (JSO)* y comparación con LMRs

*En jitomate saladette B (JSB), se identificó THFI, y en jitomate saladette orgánico (JSO), metamidofos, THFI y endosulfán

Durante la revisión bibliográfica, se encontraron estudios realizados a jitomates en España se encontraron residuos de captan y endosulfán en un intervalo de 0.006–0.1 mg/kg (Columé, A. *et al.*, 2001) y de endosulfán en un intervalo de 0.01–0.61 mg/kg (Fernández-Moreno, J. L. *et al.*, 2008). En el primer estudio, las concentraciones reportadas para captan y endosulfán se encuentran por debajo de los LMRs (2.0 y 0.5 mg/kg, respectivamente). Mientras que en el segundo estudio, el endosulfán rebasa el LMR.

Asimismo, se encontró un estudio de jitomate orgánico donde se detectaron residuos de endosulfán con una concentración de 0.16 mg/kg (González, M. *et al.*, 2003). Este valor está por debajo del LMR (0.5 mg/kg), sin embargo, el estudio indica que existe persistencia de pesticidas organoclorados en los suelos que contaminan cultivos posteriores en los que no se han utilizado pesticidas.

4.2.5. Análisis comparativo de pesticidas en los vegetales estudiados. Al realizar una comparación entre los vegetales estudiados, se observa que el metamidofos fue identificado en 4 muestras vegetales pero sólo fue cuantificado en 3 de ellas, con base en su concentración en mg/kg y en el número de veces que representa el LMR (0.01 mg/kg) correspondiente se ordenan: JSB (0.42, 42 veces) > JSA y TV (0.15, 15 veces).

Por otro lado, el metamidofos se clasifica como no persistente en el ambiente, su vida media tiene un valor de 6 a 12 días en el suelo. Debido a su baja persistencia, su potencial de bioacumulación es bajo. Sin embargo, puede causar diversos síntomas de intoxicación como debilidad muscular, incapacidad para pararse, somnolencia, diarrea, salivación excesiva, anorexia, pérdida de peso, disnea, cianosis, parálisis respiratoria y muerte (Catálogo de plaguicidas, CICOPALAFEST, 2004).

Las concentraciones de metamidofos cuantificadas en TV, JSA y JSB representan al menos 15 veces el LMR establecido para ese pesticida, además ambos vegetales son consumidos frecuentemente, por lo que es posible que los consumidores puedan desarrollar alguno de los efectos de intoxicación provocados por este pesticida.

La THFI fue identificada en todas las muestras vegetales analizadas pero sólo cuantificada en el JSB con una concentración que representa 258 veces el correspondiente LMR (0.01 mg/kg).

Como se mencionó anteriormente, la THFI es el principal compuesto de degradación del captan. El captan tiene una movilidad de moderada a alta, por lo que no es persistente. No obstante, la THFI, tiene un potencial moderado de bioacumulación y su toxicidad varía de moderada a alta (Catálogo de plaguicidas, CICOPALAFEST, 2004).

Por las características señaladas anteriormente de la THFI, sumadas a la concentración detectada en JSB, la cual representa 258 veces el LMR, los consumidores pueden sufrir intoxicaciones severas.

El malatión fue el pesticida identificado y cuantificado en todas las muestras, de acuerdo al número de veces que representan el correspondiente LMR se ordenan: CAL > JSO > TV > JSA > JSB (25.5, 1.9, 1.3, 1.2 y 1.0, respectivamente), sólo JSB estuvo dentro del límite residual. Cabe resaltar, que el LMR es más tolerante para jitomate saladette y tomate verde que para calabacita (0.5 y 0.02 mg/kg, respectivamente), lo que significa que la concentración de residuos cuantificada en CAL está más comprometida (0.51 mg/kg) respecto a JSB, JSA, TV y JSO (0.54, 0.62, 0.64 y 0.95 mg/kg, respectivamente).

El malatión no es persistente en suelos, su vida media es de hasta 1 semana. Debido a su baja persistencia no se espera que se bioacumule en los organismos. La mayor parte del malatión es metabolizado y eliminado casi por completo en 24 horas. Este compuesto muestra una toxicidad cambiante dependiendo del grupo de organismos, variando desde prácticamente nula hasta extremadamente alta, puede provocar la disfunción del sistema endócrino, afectando la glándula tiroidea (Catálogo de plaguicidas, CICOPALAFEST, 2004).

Puesto que las concentraciones cuantificadas en TV, JSA y JSO se encuentran por arriba del MRL, representan al menos 1.2 veces dicho LMR y, además dado que el jitomate saladette es considerado uno de los vegetales de mayor consumo en la región, los consumidores pueden llegar a bioacumular malatión y mostrar una intoxicación alta. El caso es más crítico para CAL, ya que la concentración detectada representa 25.5 veces el

LMR correspondiente, lo que significa que el consumo frecuente de este vegetal, puede generar bioacumulación y provocar efectos extremadamente tóxicos.

El endosulfán, fue identificado en CAL, JSB y JSO. La concentración del alfa-endosulfán en JSB fue de 3.82 mg/kg, lo cual representa el 70% de la concentración de endosulfán total, por lo tanto la cantidad total de ese residuo es de 5.46 mg/kg, valor que representa 10.9 veces el LMR para ese pesticida (0.5 mg/kg).

El endosulfán en el suelo es moderadamente persistente (hasta 8 meses). El alfa-endosulfán es menos persistente y más tóxico que el beta-endosulfán. En muchos organismos expuestos a este pesticida, se acumula hasta alcanzar una fase estacionaria; sin embargo, no persiste en sus tejidos una vez que desaparece la fuente de exposición, ya que es metabolizado rápidamente en hígado y riñón para ser eliminado del cuerpo. (Catálogo de plaguicidas, CICOPLAFEST, 2004).

Debido a las características mencionadas del endosulfán sobre persistencia, toxicidad y bioacumulación, la concentración detectada en JSB representa un riesgo para la salud de los consumidores, ya que es un vegetal consumido frecuentemente.

Finalmente, el carbofurán fue el único pesticida que no fue identificado en alguna de las muestras analizadas.

Es importante resaltar que el JSO fue considerado como un alimento orgánico y por lo tanto, es de esperarse que un alimento orgánico se encuentre libre de pesticidas. Sin embargo, del resultado del análisis, vemos que en el JSO se identificaron 3 pesticidas de los 5 que se estudiaron, captan (representado por la THFI), malatión y alfa-endosulfán, aunque sólo se haya podido cuantificar malatión. Por lo tanto, el JSO no puede considerarse como un alimento orgánico. La presencia de estos pesticidas se puede deber a varias causas, entre ellas, contaminación por aguas de riego, escurrimientos, contaminación durante la comercialización, acumulación del pesticida en el suelo de cultivo, entre otras.

El JSB fue el vegetal con mayor número de pesticidas detectados, en este vegetal se identificaron 4 de los 5 pesticidas estudiados (excepto carbofurán), 3 de ellos cuantificados (metamidofos, malatión y endosulfán), metamidofos y endosulfán en concentraciones por arriba de sus correspondientes LMRs (0.01 y 0.5 mg/kg, respectivamente).

En los vegetales estudiados se detectaron al menos 3 de los 5 pesticidas estudiados, y casi en la mayoría las concentraciones cuantificadas estuvieron por encima de los LMRs establecidos por la CE. Debemos recordar que el LMR representa la máxima concentración que puede encontrarse en un alimento después de ser tratado con un pesticida sin que dañe la salud del consumidor, por lo tanto, ninguno de los vegetales estudiados es seguro para el consumidor, ya que al menos uno de los pesticidas cuantificados rebasó el LMR correspondiente.

Además, de los estudios realizados en México solo tres están enfocados a vegetales. En los análisis realizados por Waliszewski, S. M. *et al.* en 2008, se estudiaron pesticidas organoclorados, como el lindado y DDT, en zanahoria. En este estudio concluyeron que los pesticidas organoclorados se acumulan en mayor proporción en la piel que en la pulpa de esta hortaliza.

En la investigación realizada por Hernández-Hernández, C. N. A. *et al.* en 2007, se estudiaron 3 pesticidas, clorotalonil, cloropirifos, y malatión en plantaciones de papaya, cuantificándose concentraciones de 7.4 ± 4.1 , 0.8 ± 0.5 y 2.4 ± 1.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente.

Finalmente en el estudio realizado por Pérez, M. A. *et al.*, en 2009, encontraron residuos de clorfenvinfos, malatión, diazinón, fentión y etión en brócoli, con concentraciones de 5.78, 2.67, 1.16, 0.041 y 0.024 mg/kg respectivamente. Sin embargo, las concentraciones encontradas están por debajo de los límites máximos residuales.

Finalmente, cabe señalar que es posible que el lavado de los vegetales durante 5 a 20 minutos con soluciones de ácido acético o cloruro de sodio ayude a disminuir la concentración de residuos, pero no se eliminan por completo (Zhang, Z-Y. *et al.*, 2007). Además, los pesticidas estudiados tienen diferente grado de solubilidad en agua, siendo el

endosulfán el menos soluble, a 25°C se disuelven 0.53 mg/L, por lo que es difícil de eliminar de la superficie de los alimentos durante el lavado.

4.3. Criterios de calidad interna

Para establecer la calidad de los resultados obtenidos de la técnica de extracción sólido-líquido y la técnica de GC-MS/MS aplicados a los vegetales estudiados, se consideraron los coeficientes de variación, el límite de detección (LDD) y el límite de cuantificación (LDC). En la extracción, se calcularon los coeficientes de variación, estos valores indican la variación entre cada réplica del mismo vegetal. Un valor igual o menor al 5% indica que la técnica de extracción se reprodujo entre réplicas. En la Tabla 25, se observa que los porcentajes del coeficiente de variación estuvieron entre 1.08 y 2.90, lo que significa que la variación en la masa de los extractos entre réplicas del mismo vegetal fue estadísticamente aceptable. Se realizaron 10 réplicas para cada vegetal.

Tabla 25. Porcentajes del coeficiente de variación obtenido de la extracción y del análisis en el equipo de GC-MS/MS

<i>Vegetal</i>	<i>Clave</i>	<i>Coefficiente de variación (%)</i>	
		<i>Extracción</i>	<i>Análisis en el equipo de GC-MS/MS</i>
Calabacita	CAL	2.90	2.28
Tomate verde	TV	2.22	4.99
Jitomate saladette A	JSA	2.81	16.10
Jitomate saladette B	JSB	1.08	10.48
Jitomate saladette orgánico	JSO	2.54	12.69

Se calcularon coeficientes de variación para el análisis de malatión en el equipo de GC-MS/MS utilizando los métodos contruidos a partir de la solución de trabajo de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm de pesticida con 0.5 ppm de caféina (STB), Tabla 26. Se consideraron los coeficientes obtenidos para malatión debido a que es el pesticida que aparece en todos los vegetales.

El extracto de calabacita (CAL) se analizó por triplicado, los extractos de tomate verde (TV), jitomate saladette A (JSA), jitomate saladette B (JSB) y jitomate saladette orgánico (JSO) se analizaron por duplicado.

En el análisis cuantitativo de malatión se determinó que los coeficientes de variación (CV) se encontraban entre 2.28 y 16.10%. Los CV menores se obtuvieron en calabacita y tomate verde con valores de 2.28 y 4.99%, respectivamente. Mientras que en las muestras de jitomate saladette fueron de 10.48 a 16.10%. Esta variación relativa, se atribuye a que la matriz orgánica del jitomate interfiere en mayor grado con la cuantificación de pesticidas.

En análisis de residuos de malatión en alimentos, se han reportado valores de CV de 22% para el análisis en GC-MS. Los valores reportados en este trabajo para este pesticida se encontraron por debajo del 22%, en un intervalo de 2.28 a 16.10% (Salas, J. H. *et al.*, 2003).

Para determinar la concentración mínima que puede detectarse y establecer los límites de detección (LDDs) para la curva de calibración de STA, se utilizó la solución de trabajo de 1.0 ppm de cada pesticida con 2.0 ppm de cafeína. El valor más bajo de la relación S/R obtenido en esta solución fue de 13 para THFI, Figura 14. Los LDDs obtenidos para STA se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26. LDDs y LDCs obtenidos para las curvas de calibración STA y STB

<i>Pesticida</i>	<i>LDD^a</i> ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		<i>LDC^b</i> ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	<i>STA^c</i>	<i>STB^d</i>	<i>STA^c</i>	<i>STB^d</i>
Metamidofos	0.008	0.19	0.02	0.57
(THFI)*	0.08	0.13	0.24	0.39
Carbofurán	-	0.02	-	0.05
Malatión	0.05	0.04	0.14	0.10
alfa-Endosulfán	0.004	0.14	0.01	0.41

a. Límite de detección.

b. Límite de cuantificación.

c. Soluciones de trabajo de 1.0, 5.0 y 10 ppm con 2.0 ppm de cafeína.

d. Soluciones de trabajo de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm con 0.5 ppm de cafeína.

Para determinar los LDDs de la curva de calibración STB, se utilizó la solución de trabajo con de 0.5 ppm de cada pesticida y 0.5 ppm de cafeína, Figura 15. El valor de la relación S/R más bajo fue de: 48 para THFI. En la Tabla 26 se observan los LDDs para la curva de calibración STB.

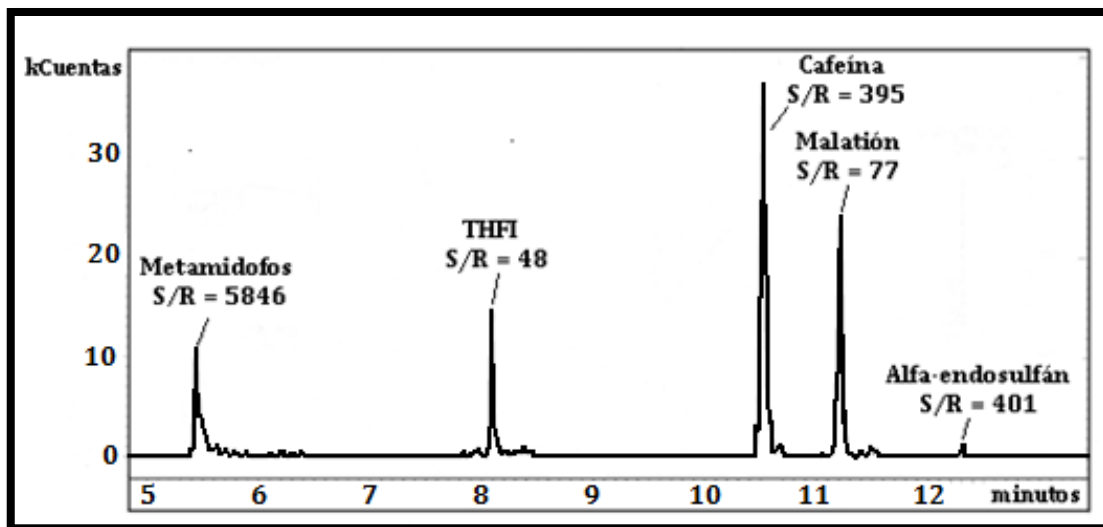


Figura 14. Cromatograma de la solución de trabajo de 1.0 ppm de cada pesticida y 2.0 ppm de estándar interno (cafeína), mostrando las relaciones S/R

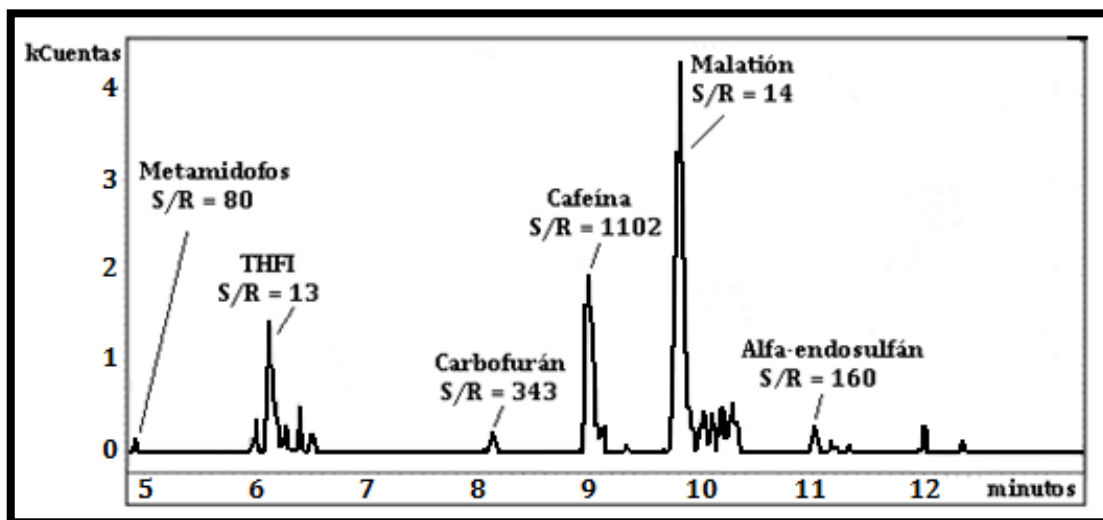


Figura 15. Cromatograma de la solución de trabajo de 0.5 ppm de cada pesticida y 0.5 ppm de estándar interno (cafeína), mostrando las relaciones S/R

Los valores de LDDs obtenidos se encuentran dentro del intervalo reportado por Martínez-Vidal, J. L., *et al.*, (2006) y Garrido-Frenich, A., *et al.*, (2005). Estos autores utilizaron LDDs de 0.01-39.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para el análisis de pesticidas de varios alimentos por GC-MS/MS.

Del mismo modo, se obtuvieron los límites de cuantificación (LDCs) para STA y STB. Se utilizaron las ecuaciones de las curvas de calibración para establecer las concentraciones

mínimas asegurando que cada pesticida tuviera una relación S/R superior a 10. Los LDCs para la curva de calibración STA tuvieron valores entre 0.01 y 0.24 µg/kg. Para la curva de calibración STB, los LDCs variaron entre 0.10 y 0.57 µg/kg, Tabla 26.

Martínez-Vidal, J. L. *et al.*, en el año 2006 realizaron el análisis de pesticidas en varios alimentos con la técnica de GC-MS/MS, estableciendo LDC para cada uno de los 130 pesticidas multi-clase que estudiaron. Por ejemplo, para el metamidofos reportan un LDC de 0.55 µg/kg, valor por arriba del obtenido en este trabajo (0.024 µg/kg). Para el malatión reportan un valor de 0.02 µg/kg, que es menor al que se alcanzó en este estudio (0.10 µg/kg).

5. CONCLUSIONES

El uso de acetato de etilo permitió la extracción de pesticidas organofosforados (malatión y metamidofos), organoclorados (alfa-endosulfán) y dicarboxiimidaz (tetrahidroftalimida) de los vegetales estudiados.

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa/masa o en cascada con triple cuadrupolo (GC-MS/MS-QqQ) permitió separar, identificar y cuantificar inequívocamente los residuos de captan, carbofurán, alfa-endosulfán, malatión y metamidofos en las muestras de calabacita, tomate verde y jitomate saladette.

Para cada compuesto, se crearon métodos de identificación y cuantificación. Para la identificación se consideraron características de los iones producto calificadoros: tiempos de retención, porcentaje de incertidumbre y número de iones calificadoros detectados. Para la cuantificación del ión cuantificador se utilizó el método de adición estándar, empleando cafeína como estándar interno, se evaluó el área e intensidad del pico del ión cuantificador.

Se realizó la cuantificación de los residuos en el orden de partes por millón (ppm).

Se consideraron diversos criterios de calidad, como: estándar interno, coeficientes de variación (CVs), límites de detección (LDDs) y límites de cuantificación (LDCs).

En todos los vegetales estudiados se detectaron residuos de al menos tres de los cinco pesticidas estudiados.

En calabacita (CAL) se identificó tetrahidroftalimida (THFI), malatión y alfa-endosulfán. Se cuantificó malatión, con concentraciones de 0.14 y 0.51 mg/kg, respectivamente (LMR malatión: 0.02 mg/kg).

En tomate verde se identificó metamidofos, THFI y malatión. Se cuantificó metamidofos con 0.15 mg/kg y malatión con 0.64 mg/kg (LMR metamidofos: 0.01 mg/kg y LMR malatión: 0.5 mg/kg).

En jitomate saladette A se identificó y cuantificó metamidofos, THFI y malatión con 0.15, 2.58 y 0.64 mg/kg, respectivamente, (LMR metamidofos: 0.01 mg/kg, LMR THFI: 0.01 mg/kg y LMR malatión: 0.5 mg/kg).

En jitomate saladette B se identificó metamidofos, THFI, malatión y alfa-endosulfán. Se cuantificaron 0.42 mg/kg de metamidofos, 0.54 mg/kg de malatión y 3.82 mg/kg de alfa-endosulfán (LMR metamidofos: 0.01 mg/kg, LMR malatión: 0.5 mg/kg y LMR endosulfán: 0.5 mg/kg).

En el jitomate saladette orgánico se identificó THFI, malatión y alfa-endosulfán. Se cuantificaron 0.95 mg/kg de malatión (LMR malatión: 0.5 mg/kg), por lo que no puede considerarse un alimento orgánico.

En los vegetales estudiados, los residuos de pesticidas cuantificados cuyas concentraciones rebasaron el correspondiente LMR establecido por la CE, no pueden considerarse como seguros para los consumidores, ya que dichas concentraciones pueden afectar su salud causando daño neurológico crónico, disfunción de los sistemas inmune, reproductivo y endocrino, entre otros, además la acumulación de estos pesticidas está relacionada con enfermedades como el cáncer (Dömötörova, M.; Matisová, E., 2008).

6. PERSPECTIVAS

Realizar planes de monitoreo para la evaluación de los residuos de pesticidas en vegetales, basándose en programas desarrollados por aquellos países que realizan monitoreos periódicamente.

Extender el análisis de residuos a otros vegetales considerados de consumo frecuente en la región Mixteca, como lechuga, papa, otra variedad de chile, cebolla, y de ser necesario, adaptar la técnica de extracción sólido-líquido.

Realizar el análisis de residuos de pesticidas en vegetales tomando las muestras de diferentes lugares de origen, como el terreno de cultivo y la zona de comercialización, para establecer cuál es el punto en el que la concentración de residuos se incrementa.

Analizar algunas frutas de mayor consumo en la región Mixteca, ya que debido a la semejanza en la matriz respecto al contenido de agua, pudiera aplicarse la misma técnica de extracción sólido-líquido.

Si el interés del estudio está dirigido a la determinación de metamidofos, se recomienda usar ionización química, a concentraciones por debajo de 0.5 mg/kg.

Realizar el estudio de residuos de pesticidas en las diferentes épocas del año y determinar si existe alguna relación entre la época del año y la concentración de residuos en los vegetales. Determinar si esta concentración varía de época en época (Bhanti, M.; Taneja, A., 2007).

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldana-Madrid, M. L.; Valdez-Hurtado, S.; Vargas-Valdez, N. D.; Salazar-Lopez, N. J.; Silveira-Gramont, M. I.; Loarca-Piña, F. G.; Rodríguez-Olibarria, G.; Wong-Corral, F. J.; Borboa-Flores, J.; Burgos-Hernández, A. **2008**. "Insecticide residues in stored grains in Sonora, Mexico: quantification and toxicity testing". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. *80*, *2*, 93-96.
- Angioni, A.; Garau, V. L.; Del Real, A. A.; Melis, M.; Minelli, E. V. Tuberoso, C.; Cabras, P. **2003**. "GC-ITMS determination and degradation of captan during winemaking". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. *51*, 6761-6766.
- Araoud, M.; Douki, W.; Rhim, A.; Najjar, M.F.; Gazzah, N. **2007**. "Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography-mass spectrometry". *Journal of Environmental Science and Health Part B*. *42*, *1*, 179-187.
- Bhanti, M.; Taneja, A. **2007**. "Contamination of vegetables of different seasons with organophosphorous pesticides and related health risk assessment in northern India". *Chemosphere*. *64*, *1*, 63-68.
- Bescos, D.; Monge, M. C.; Debrauwer, L.; Bories, G. F. **1995**. "Laboratory simulation of captan residues degradation during apple processing". *Food Chemistry*. *54*, *2*, 205-211.
- Butler, J.; Conoley, M. **2007**. "Comparison of GC/MS/MS to GC/MS analysis of pesticides in vegetables". *Thermo Fisher Scientific*. Austin, TX, USA.
- Columé, A.; Cárdenas, S.; Gallego, M.; Valcárcel, M. **2001**. "Semiautomatic multiresidue gas chromatographic method for the screening of vegetables for 25 organochlorine and pyrethroids pesticides". *Analytica Chimica Acta*. *436*, 153-162.
- Dömötöröva, M.; Matisová, E. **2008**. "Fast gas chromatography for pesticide residue analysis". *Journal of Chromatography A*. *1207*, 1-16.
- Fernández-Moreno, J. L.; Garrido-Frenich, A.; Plaza-Bolaños, P.; Martínez-Vidal, J. L. **2008**. "Multiresidue method for the analysis of more than 140 pesticides residues in fruits and vegetables by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry". *Journal of Mass Spectrometry*. *43*, 1235-1254.
- Frank, R.; Northover, J.; Braun, H. E. **1985**. "Persistence of captan on apples, grapes and pears in Ontario, Canada, 1981-1983". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. *33*, 514-518.
- García de Llasera, M. P.; Reyes-Reyes, M. L. **2009**. "A validated matrix solid-phase dispersion method for the extraction of organophosphorus pesticides from bovine samples". *Food Chemistry*. *114*, *4*, 1510-1516.
- Garrido-Frenich, A.; González-Rodríguez, M. J.; Arrebola, F. J.; Martínez-Vidal, J. L. **2005**. "Potentiality of gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry in vanguard and rearguard methods of pesticide residues in vegetables". *Analytical Chemistry*. *77*, 4640-4648.

- Garrido-Frenich, A.; Martínez-Vidal, J. L.; López-López, T.; Cortés-Aguado, S.; Martínez-Salvadora, I. **2004**. "Monitoring multi-class pesticide residues in fresh fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. 1048, 199-206.
- Garrido-Frenich, A.; Plaza-Bolaños, P.; Martínez-Vidal, J. L. **2007**. "Multiresidue analysis of pesticides in animal liver by gas chromatography using triple quadrupole tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. 1153, 194-202.
- Garrido-Frenich, A.; Plaza-Bolaños, P.; Martínez-Vidal, J. L. **2008**. "Comparison of tandem-in-space and tandem-in-time mass spectrometry in gas chromatography determination of pesticides: Application to simple and complex food samples". *Journal of Chromatography A*. 1203, 229-238.
- González, M.; Miglioranza, K. S. B.; Aizpún de Moreno, J. E.; Moreno, V. J. **2003**. "Occurrence and distribution of organochlorine pesticides (OCPs) in tomato (*Lycopersicon esculentum*) crops from organic production". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 1353-1359.
- Hernández-Hernández, C. N. A.; Valle-Mora, J.; Santiesteban-Hernández, A.; Bello-Mendoza, R. **2007**. "Comparative ecological risks of pesticides used in plantation production of papaya: Application of the SYNOPSIS indicator". *Science of the Total Environment*. 381, 1-3, 112-125.
- Hill, A. R. C.; Reynolds, S. L. **2002**. "Unit-to-unit variability of pesticide residues in fruit and vegetables". *Food Additives & Contaminants*. 19, 8, 733-747.
- Jimenez-Castro, C.; Mellink, E.; Villaescusa-Celaya, J. **1995**. "DDT and its metabolites in Western gull eggs from southern California and northwestern Baja California". *Bull Environment Contamination and Toxicology*. 55, 3, 374-381.
- Kotretsou, S. I.; Koutsodimou, A. **2006**. "Overview of the applications of tandem mass spectrometry (MS/MS) in food analysis of nutritionally harmful compounds". *Food Reviews International*. 21, 3, 125-164.
- Krynitsky, A. J.; Lehotay, S. J. **2003**. "Overview of analytical technologies available to regulatory laboratories for determination of pesticide residues". *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals*. John Wiley & Sons Ltd. U. S. A.
- Lambropoulou, D. A.; Albanis, T. A. **2007**. "Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 389, 1663-1683.
- Lehotay, S. J.; Calverde-Gracia, A. **1997**. "Evaluation of different solid-phase traps for automated collection and clean-up in the analysis of multiple pesticides in fruits and vegetables after supercritical fluid extraction". *Journal of Chromatography A*. 765, 69-84.
- Lehotay, S. J.; Mastovska, K.; Amirav, A.; Flalkov, A. B.; Alon, T.; Martos, P. A.; de Kok, A.; Fernández-Alba, A. R.; **2008**. "Identification and confirmation of chemical residues in food by chromatography-mass spectrometry and other techniques". *Trends in Analytical Chemistry*. 27, 11, 1070-1090.
- Martínez-Vidal, J. L.; Arrebola, F. J.; Mateu-Sánchez, M. **2002**. "Application of gas chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of pesticides in fruits and vegetables". *Journal of Chromatography A*. 959, 203-213.

- Martínez-Vidal, J. L.; Arrebola-Liébanas, F. J.; González-Rodríguez, M.J.; Garrido-Frenich, A.; Fernández-Moreno, J. L. **2006**. "Validation of a gas chromatography/triple quadrupole mass spectrometry based method for the quantification of pesticides in food commodities". *Rapid Communication Mass Spectrometry*. *20*, 365-375.
- Mezcua, M.; Ferrer, C.; García-Reyes, J. F.; Martínez-Bueno, M. J.; Sigrist, M.; Fernández-Alba, A. R. **2009**. "Analyses of selected non-authorized insecticides in peppers by gas chromatography/mass spectrometry and gas chromatography/tandem mass spectrometry". *Food Chemistry*. *112*, 221-225.
- Mocholí, F. **2001**. "Nuevas tendencias en el análisis de multirresiduos de plaguicidas en vegetales mediante GC/MS y GC/MS/MS". *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*. *129*, 33-35.
- Pang, G.-F.; Fan, C.-L.; Liu, Y.-M.; Cao, Y.-Z.; Zhang, J.-J.; Fu, B.-L.; Li, X.-M.; Li, Z.-Y.; Wu, Y.-P. **2006**. "Multi-residue method for the determination of 450 pesticide residues in honey, fruit juice and wine by double-cartridge solid-phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Food Additives and Contaminants*. *22*, 3, 777-810.
- Pardío, V. T.; Waliszewski, K. N.; Landín, L. A.; Bautista, R. G. **2003**. "Organochlorine pesticide residues in cow's milk from a tropical region of Mexico". *Food Additives and Contaminants*. *20*, 3, 259-269.
- Pérez, M. A.; Segura, A.; García, R.; Colinas, T.; Pérez, M.; Vázquez, A.; Navarro, H. **2009**. "Residuos de plaguicidas organofosforados en cabeza de brócoli (*brassica oleracea*) determinados por cromatografía de gases". *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. *25*, 2, 103-109.
- Plaza-Bolaños, P.; Fernández-Moreno, J. L.; Shtereva, D. D.; Garrido-Frenich, A.; Martínez-Vidal, J. L. **2007**. "Development and validation of a multiresidue method for the analysis of 151 pesticide residues in strawberry by gas chromatography coupled to a triple quadrupole mass analyzer". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. *21*, 2282-2294.
- Poulsen, M. E.; Andersen, J. H. **2003**. "Results from the monitoring of pesticide residues in fruit and vegetables on the Danish market, 2000-01". *Food Additives and Contaminants*. *20*, 8, 742-757.
- Salas, J. H.; González, M. M.; Noa, M.; Pérez, N. A.; Díaz, G.; Gutiérrez, R.; Zazueta, H.; Osuna, I. **2003**. "Organophosphorus pesticide residues in mexican commercial pasteurized milk". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. *51*, 4468-4471.
- Uresti-Martín, R. M.; Santiago-Adame, R.; Días-Morales, N. E.; Gutiérrez-Lozano, J.; Vázquez, M.; Ramírez de León, J. A. **2008**. "Evaluación preliminar de la presencia de pesticidas organoclorados en pescados de la presa Vicente Guerrero (Tamaulipas, México)". *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. *6*, 1, 48-55.
- Waliszewski, S. M.; Carvajal, O.; Gómez-Arroyo, S.; Amador-Muñoz, O.; Villalobos-Pietrini, R.; Hayward-Jones, P. M.; Valencia-Quintana, R. **2008**. "DDT and HCH isomer levels in soils, carrot root and carrot leaf samples". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. *81*, 4, 343-347
- Waliszewski, S. M.; Gómez-Arroyo, S.; Infanzón, R. M.; Carvajal, O.; Villalobos-Pietrini, R.; Trujillo, P.; Maxwell, M. **2004**. "Persistent organochlorine pesticide levels in bovine fat from Mexico". *Food Additives and Contaminants*. *21*, 8, 774-780.

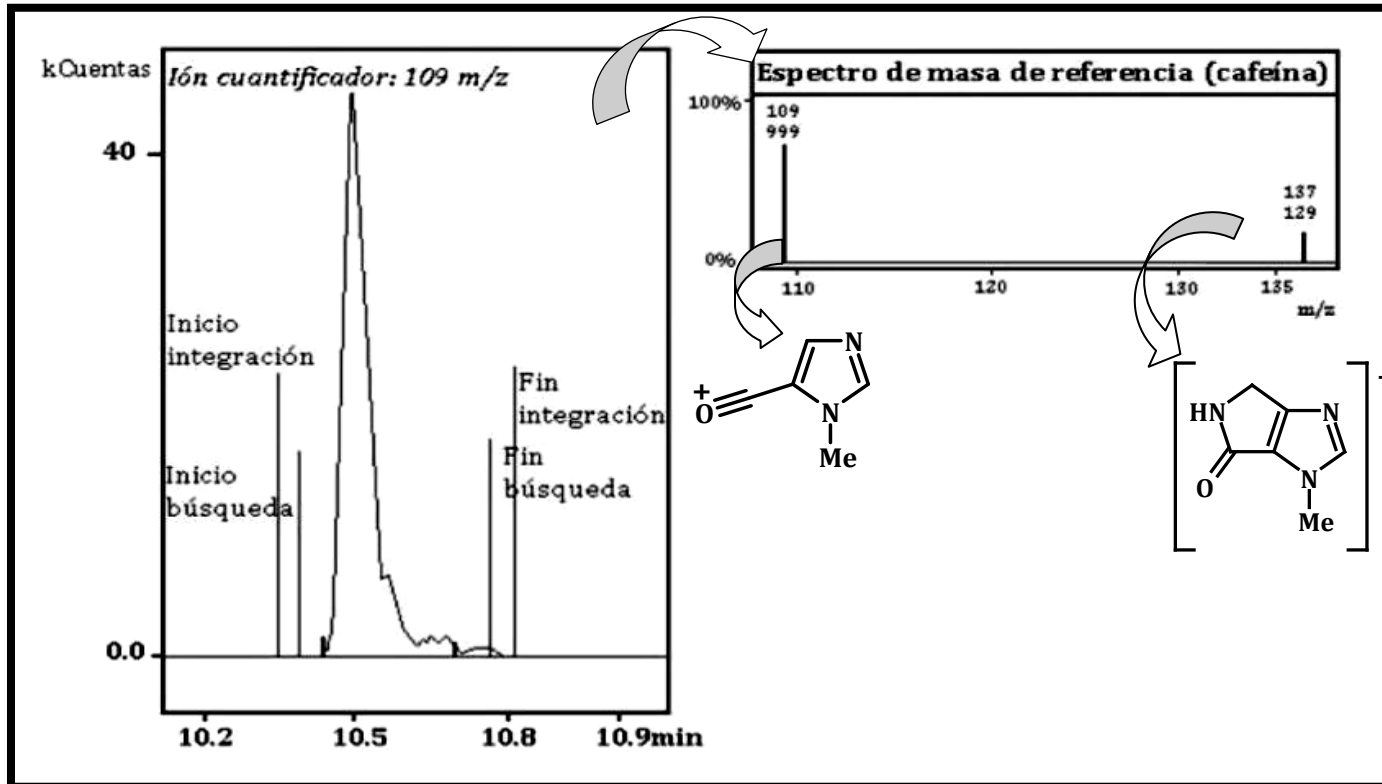
- Waliszewski, S. M.; Gómez-Arroyo, S.; Carvajal, O.; Villalobos-Pietrini, R.; Infanzón, R. M. **2004**. "Uso del ácido sulfúrico en las determinaciones de plaguicidas organoclorados". *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 20, 4, 185-192.
- Waliszewski, S. M.; Pardío V. T.; Waliszewski, K. N.; Chantiri, J. N.; Aguirre, A. A.; Infanzón, R. M.; Rivera, J. **1997**. "Organochlorine pesticide residues in cow's milk and butter in Mexico". *Science of the Total Environment*. 208, 1-2, 127-132.
- Waliszewski, S. M.; Villalobos-Pietrini, R.; Gómez-Arroyo, S.; Infanzón, R. M. **2003**. "Persistent organochlorine pesticides in Mexican butter". *Food Additives and Contaminants*. 20, 4, 361-367.
- Waliszewski, S. M.; Villalobos-Pietrini, R.; Gómez-Arroyo, S.; Infanzón, R. M. **2003**. "Persistent organochlorine pesticide levels in cow's milk samples from tropical regions of Mexico". *Food Additives and Contaminants*. 20, 3, 270-275.
- Walorczyk, S. **2007**. "Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. 1165, 200-212.
- Wylie, P.; Zweigenbaum, J.; Churley, M.; Meng, C-K.; Zhe, C. **2008**. "Comprehensive screening, confirmation, and quantification of organic pesticides in foods by GC-MS and LC-MS". *Current Trends in Mass Spectrometry*. 33-38.
- Zhang, Z-Y.; Liu, X-J.; Hong, X-Y. **2007**. "Effects of home preparation on pesticides residues in cabbage". *Food Control*. 18, 1484-1487.

8. OTRAS FUENTES CONSULTADAS

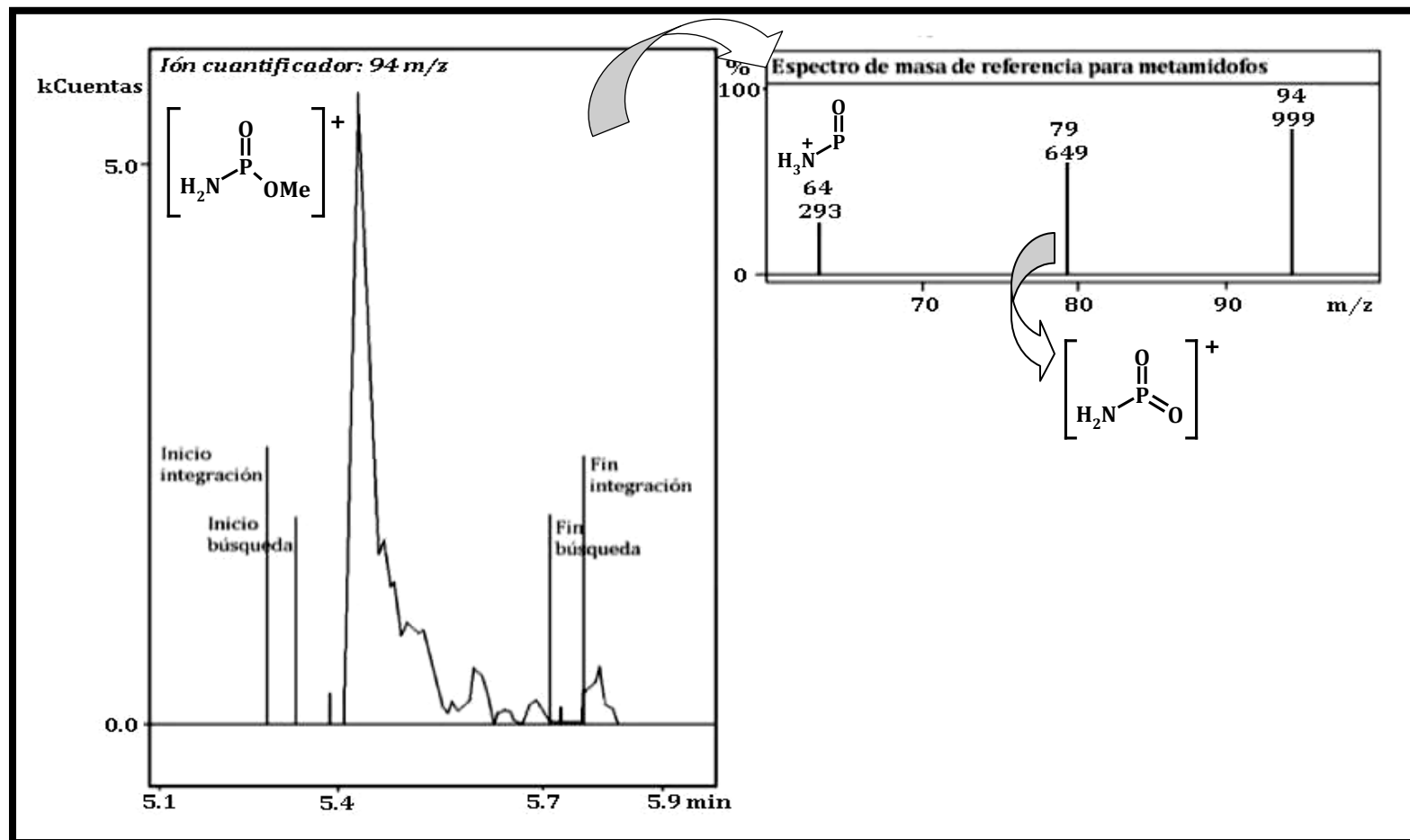
- Alarcón-Rodríguez, R. **2004**. Criptorquidias y xenoestrogenicidad por pesticidas en la provincia de Almería. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Fecha de consulta: marzo 2008. URL: <http://hera.ugr.es/tesisugr/15401133.pdf>
- Albert, L. A. **1990**. Los plaguicidas, el ambiente y la salud. Centro de ecodesarrollo. Primera edición. México, D.F.
- Anuario Estadístico de la Producción Agrícola, **2005**, SAGARPA. INEGI, México, D.F.
- Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. CICOPLAFEST. CATALOGO DE PLAGUICIDAS. Fecha de consulta: marzo 2009. URL: <http://www.semarnat.gob.mx/gestionambiental/riiq/Documents/catalogo%20plag/INICIO.pdf>
- Dart, R. C.; *et al.* **2003**. Medical Toxicology. 3rd. Edition. *Editorial Lippincott Williams & Wilkins*. U.S.A. Pp. 1914.
- Directiva 91/414/ECC del Diario Oficial de las Comunidades Europeas y regulación N° 396/**2005**. URL: http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm. Update: mayo 2009. Accesada: agosto 2009.
- Directiva 2002/63/CE de la comisión de 11 de julio de **2002** por la que se establecen los métodos comunitarios de muestreo para el control oficial de residuos de plaguicidas en los productos de origen vegetal y animal. URL: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:187:0030:0043:ES:PDF>. Accesada: noviembre 2008.
- Method 1668, Revision A. Chlorinated Biphenyl Congeners in Water, Soil, Sediment, Biosolids, and Tissue by HRGC/HRMS. **2003**. Environmental Protection Agency (EPA). U.S.A.
- National Institute for Occupational Safety and Health. NIOSH. <http://www.cdc.gov/niosh/npg/npgdcas.html>. Accesada: octubre 2009.
- Patnaik, P. **2004**. Dean's Analytical Chemistry Handbook. 2nd. Edition. *McGraw Hill Book Company*. U.S.A. Pp. 1280.
- Roberts, T.; Hutson, D. **1999**. Metabolic Pathways of Agrochemicals. Part 2. Insecticides and Fungicides. *The Royal Society of Chemistry*. U. K. Pp. 1908.
- Rubinson, K. A.; Rubinson, J. F. **2001**. Análisis instrumental. 1ra. Edición. Pearson Editorial, S. A. Madrid, España. Pp. 872.

9. APÉNDICES

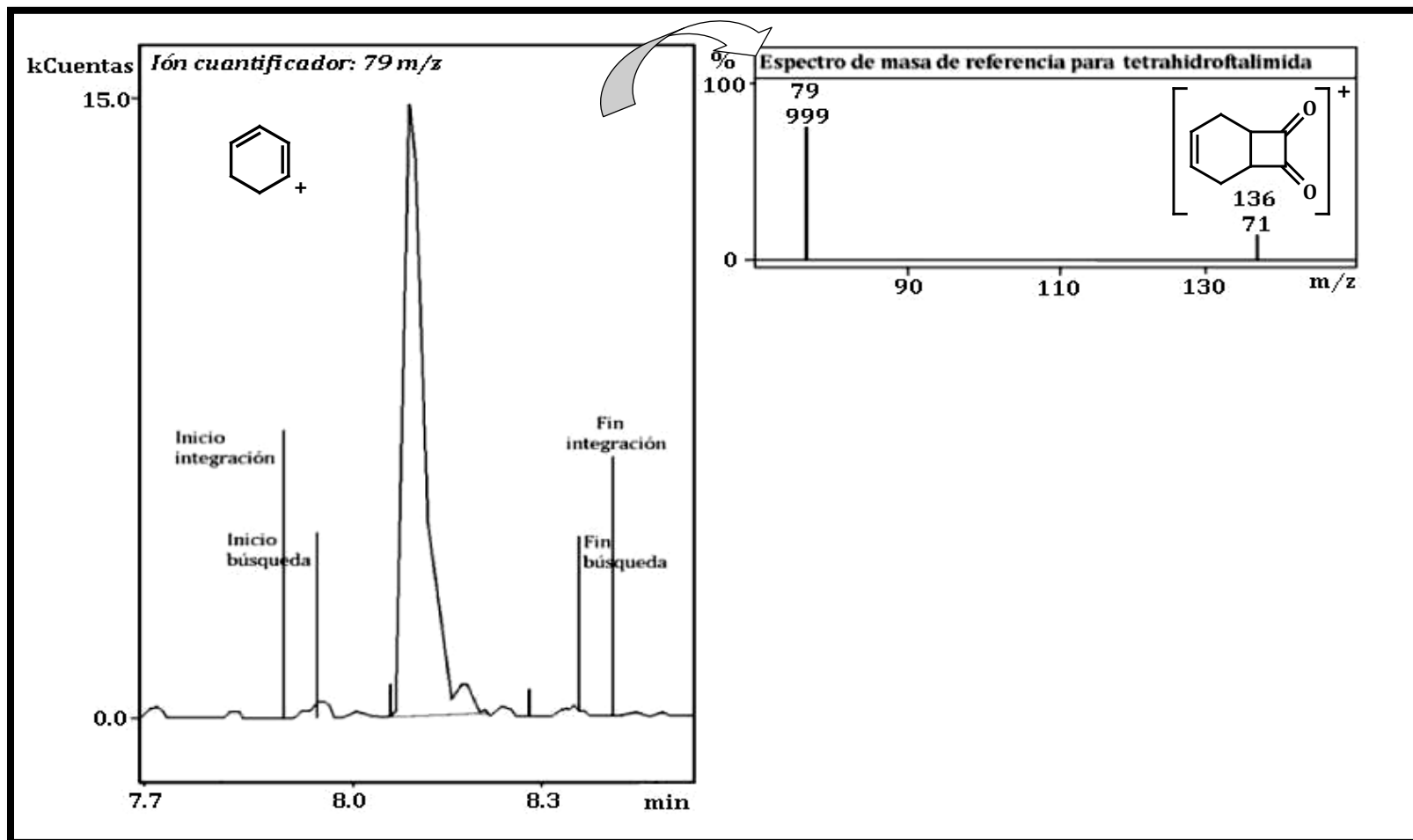
APÉNDICE 1. Cromatogramas y espectros de masa/masa de los pesticidas y estándar interno en las soluciones de trabajo



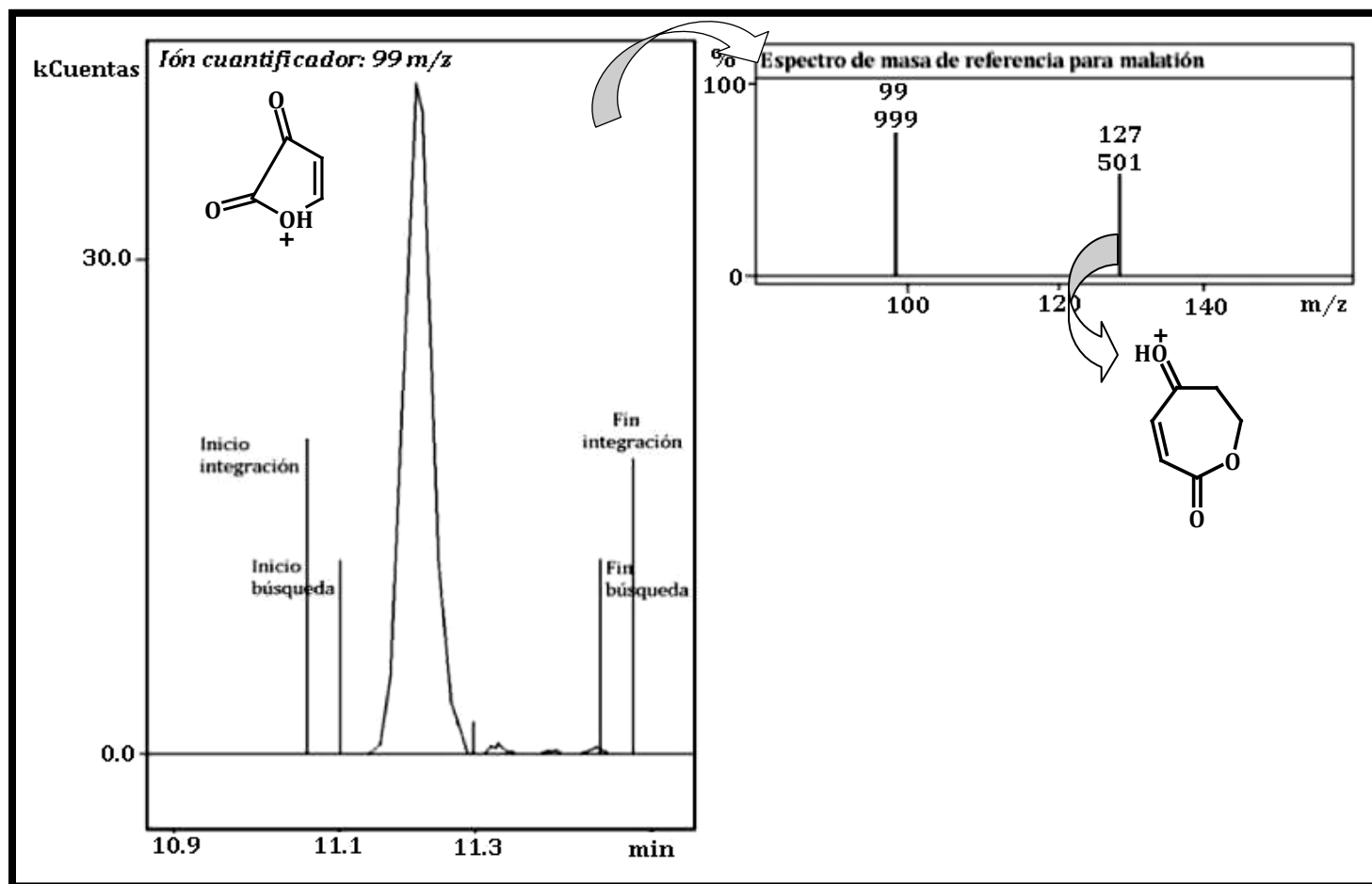
Cromatograma y espectro de masa/masa de referencia del estándar interno (cafeína), mostrando los iones cuantificador y calificador resultado del re-cálculo de las soluciones de trabajo STA (1.0, 5.0 y 10 ppm con 2.0 ppm de cafeína)



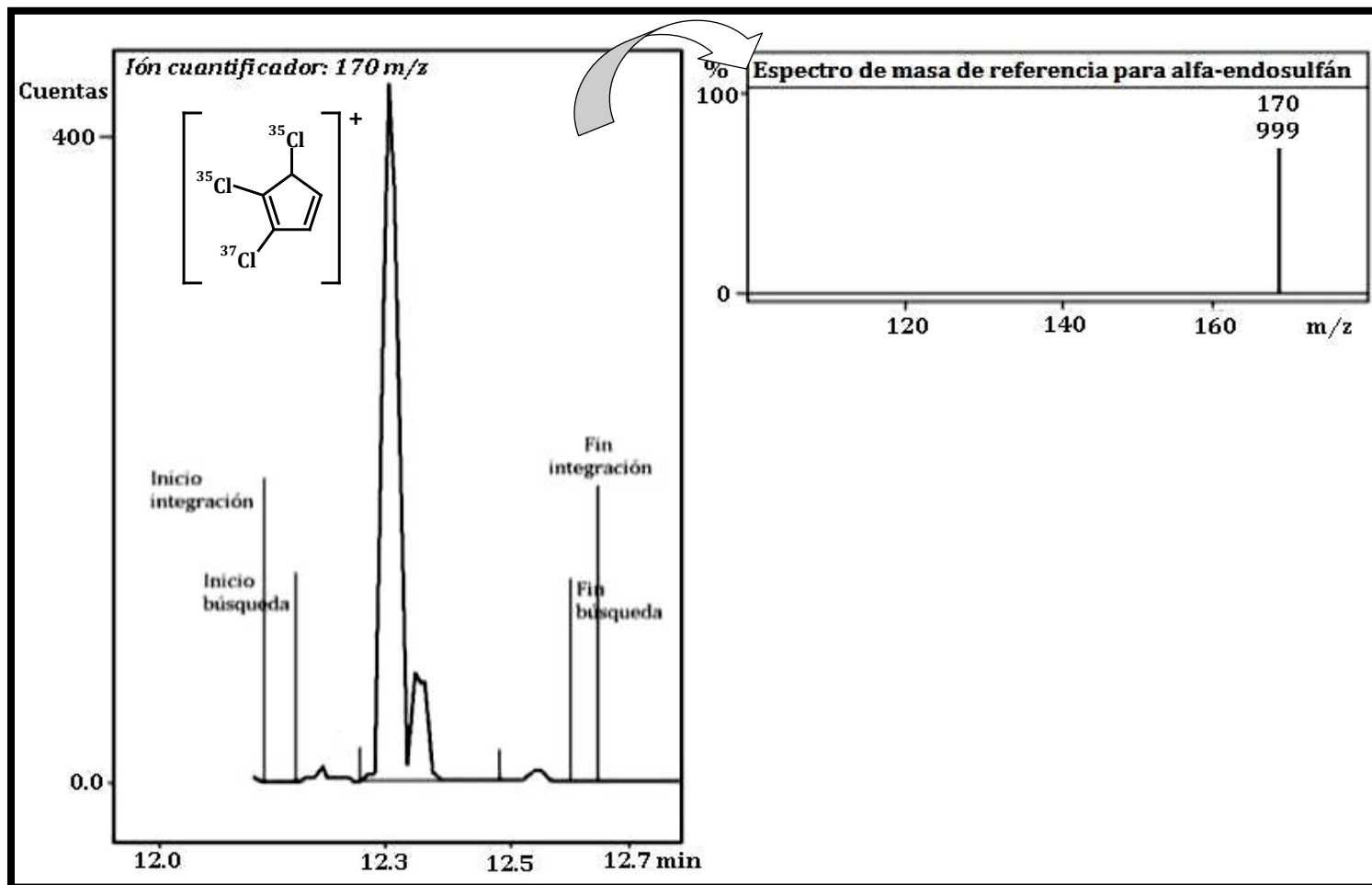
Cromatograma y espectro de masa/masa de referencia del de metamidofos, mostrando los iones cuantificador y calificador resultado del re-cálculo de las soluciones de trabajo STA (1.0, 5.0 y 10 ppm con 2.0 ppm de cafeína)



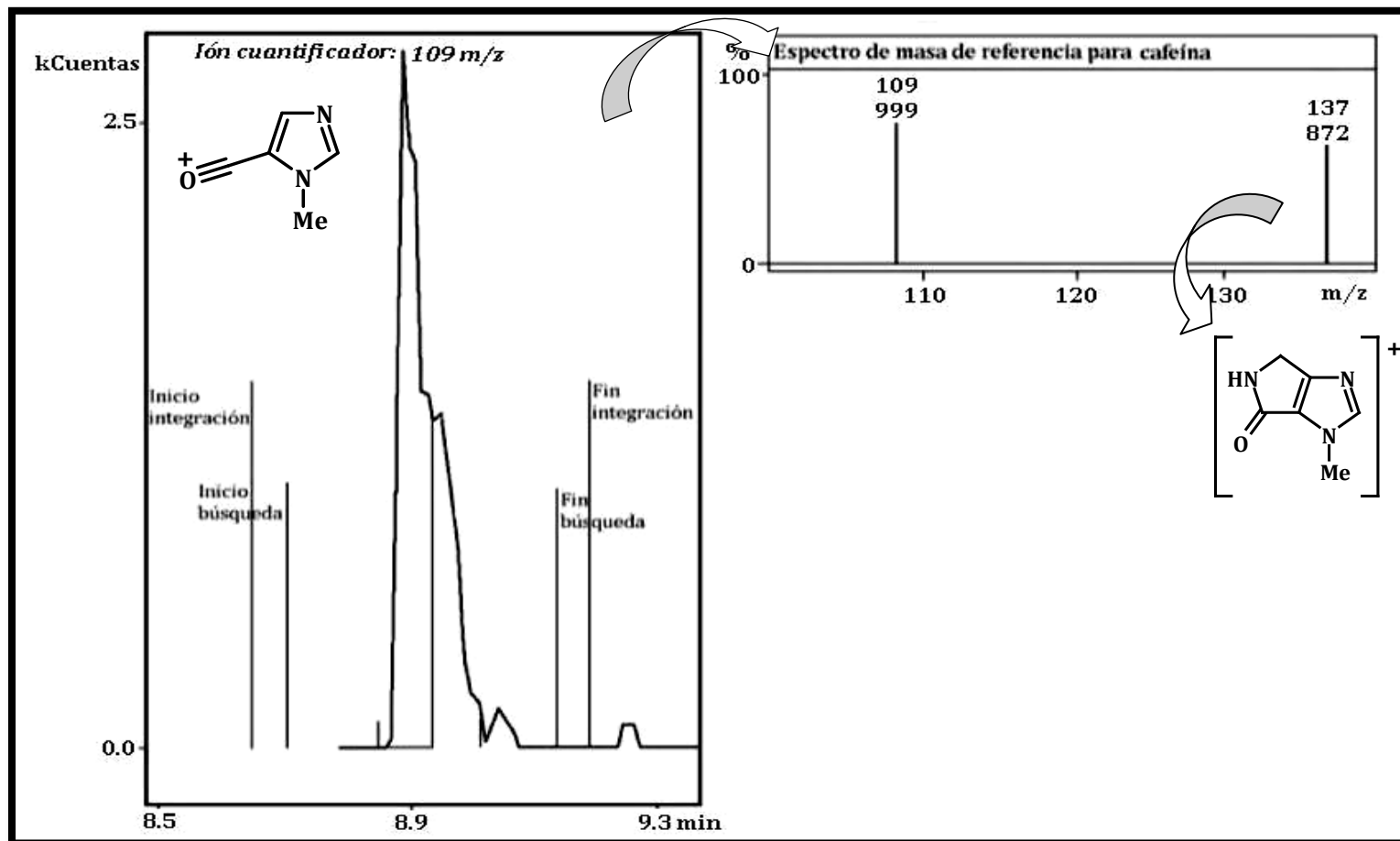
Cromatograma y espectro de masa/masa de la tetrahydrofthalimida (THFI), mostrando los iones cuantificador y calificador resultado del re-cálculo de las soluciones de trabajo STA (1.0, 5.0 y 10 ppm con 2.0 ppm de cafeína)



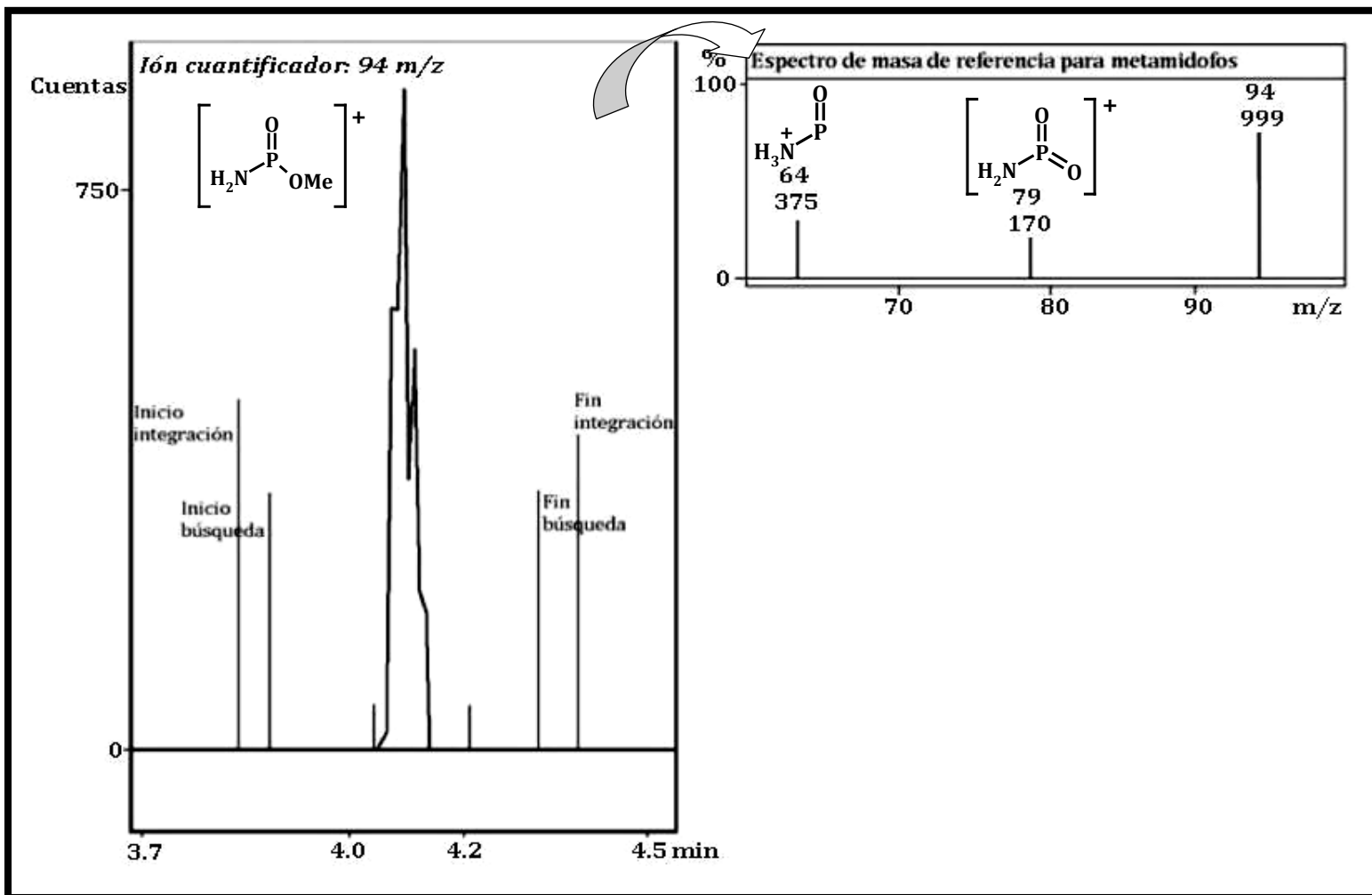
Cromatograma y espectro de masa/masa del malatión, mostrando los cuantificador y calificador resultado del re-cálculo de las soluciones de trabajo STA (1.0, 5.0 y 10 ppm con 2.0 ppm de cafeína)



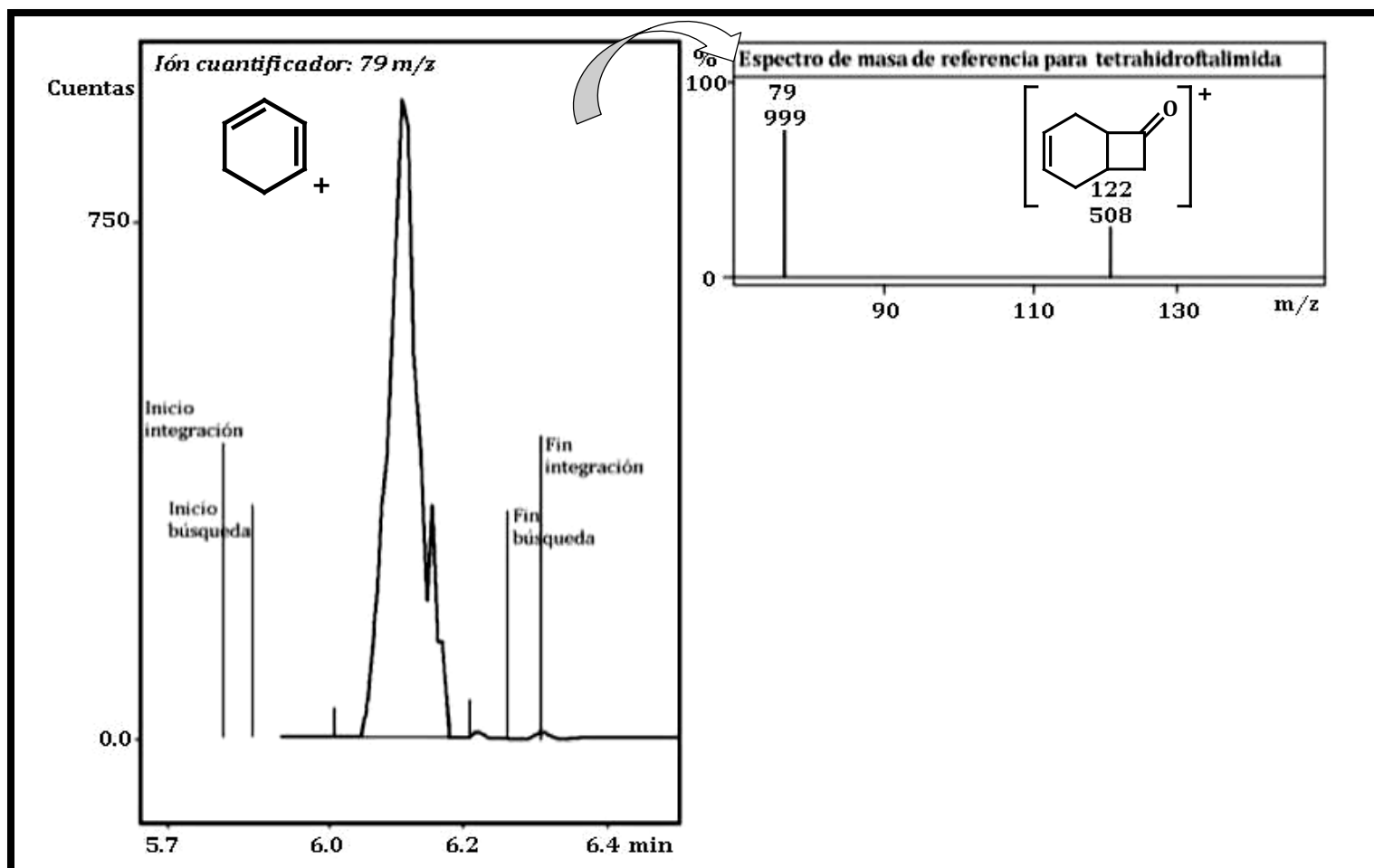
Cromatograma y espectro de masa/masa del alfa-endosulfán, mostrando el ión cuantificador resultado del recálculo de las soluciones de trabajo STA (1.0, 5.0 y 10 ppm con 2.0 ppm de cafeína)



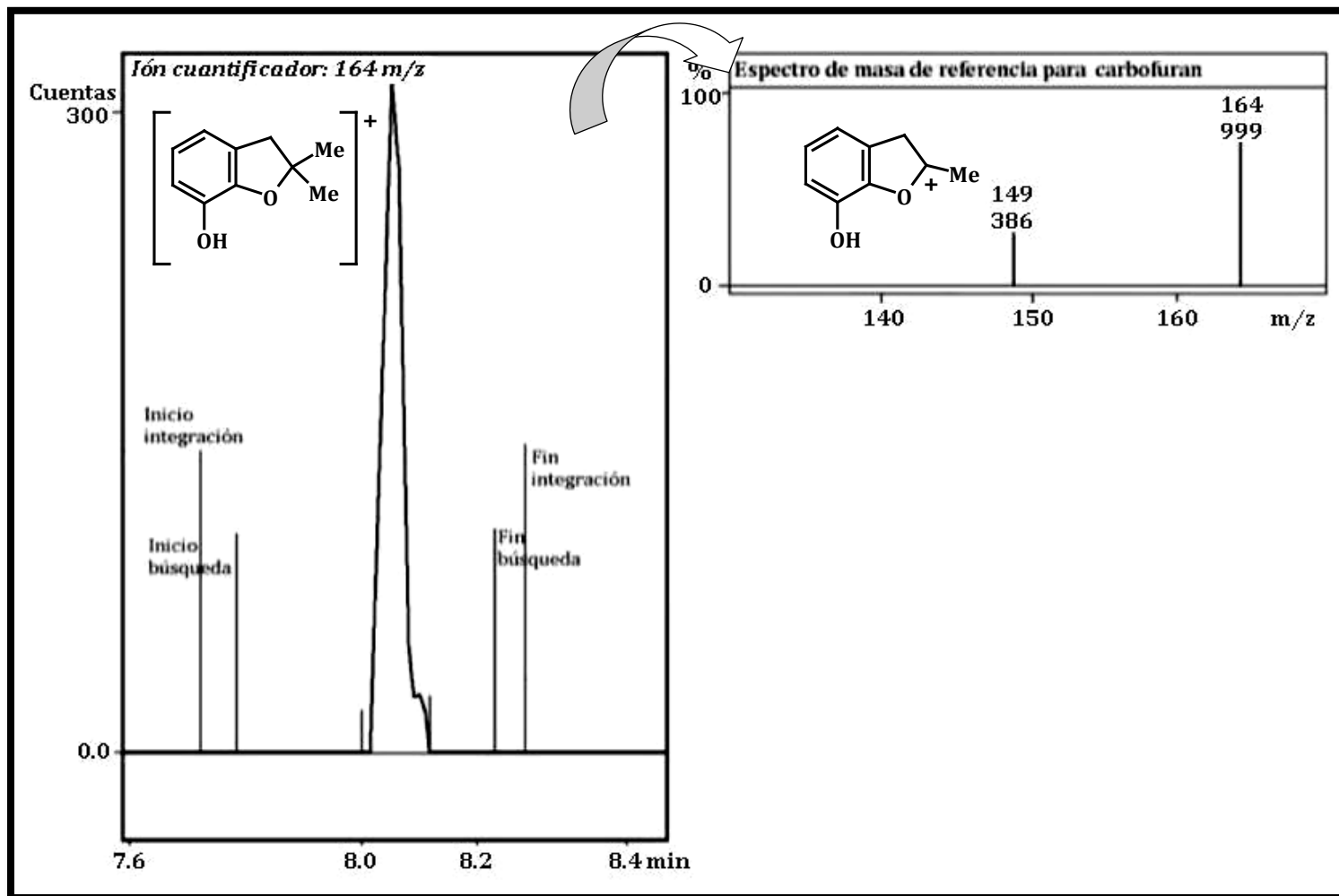
Cromatograma y espectro de masa/masa del estándar interno (cafeína), mostrando los iones cuantificador y calificador resultado del re-cálculo de las soluciones de trabajo STB (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm con 0.5 ppm de cafeína)



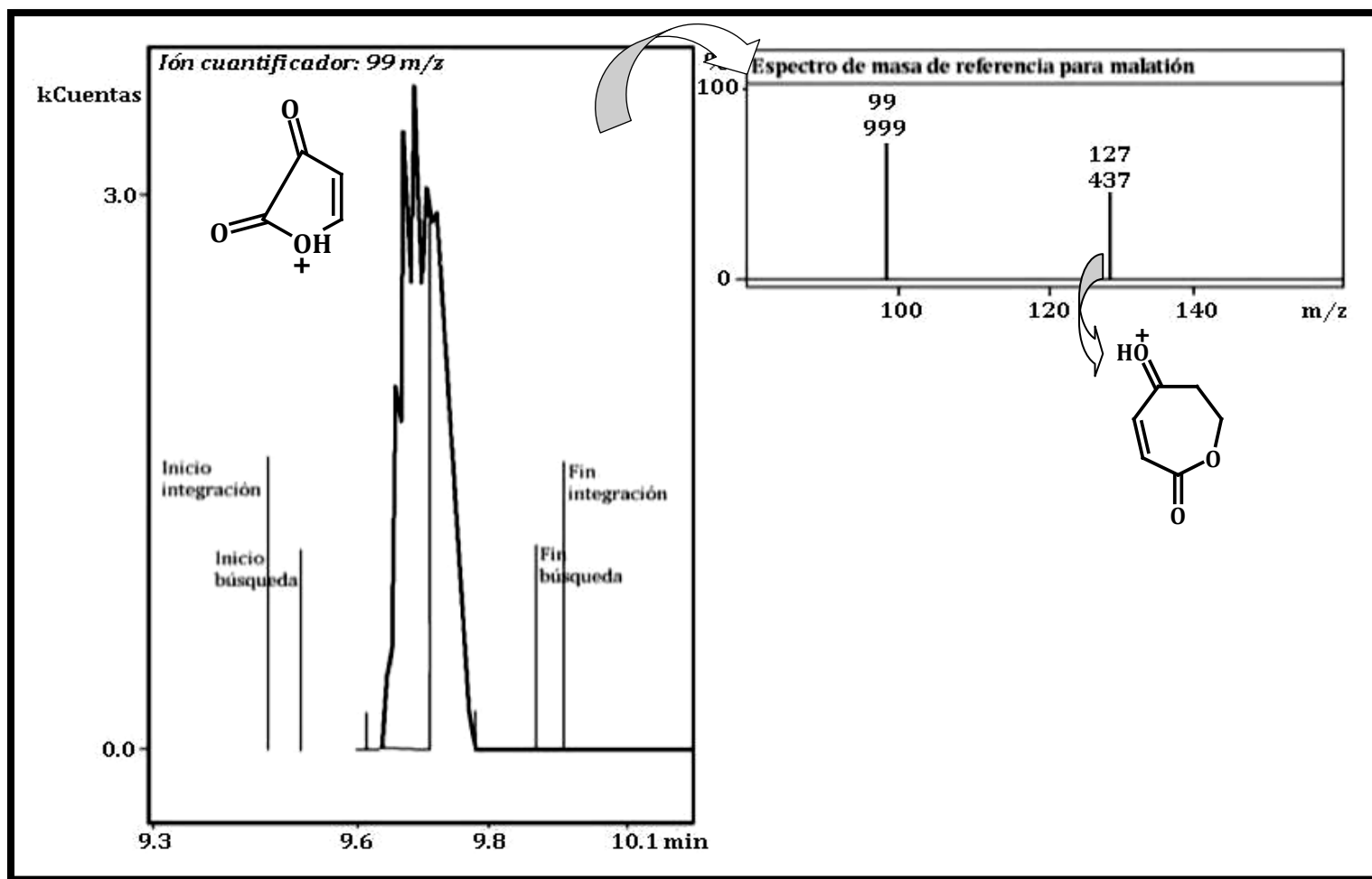
Cromatograma y espectro de masa/masa del metamidofos, mostrando los iones cuantificador y calificador resultado del recálculo de las soluciones de trabajo STB (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm con 0.5 ppm de cafeína)



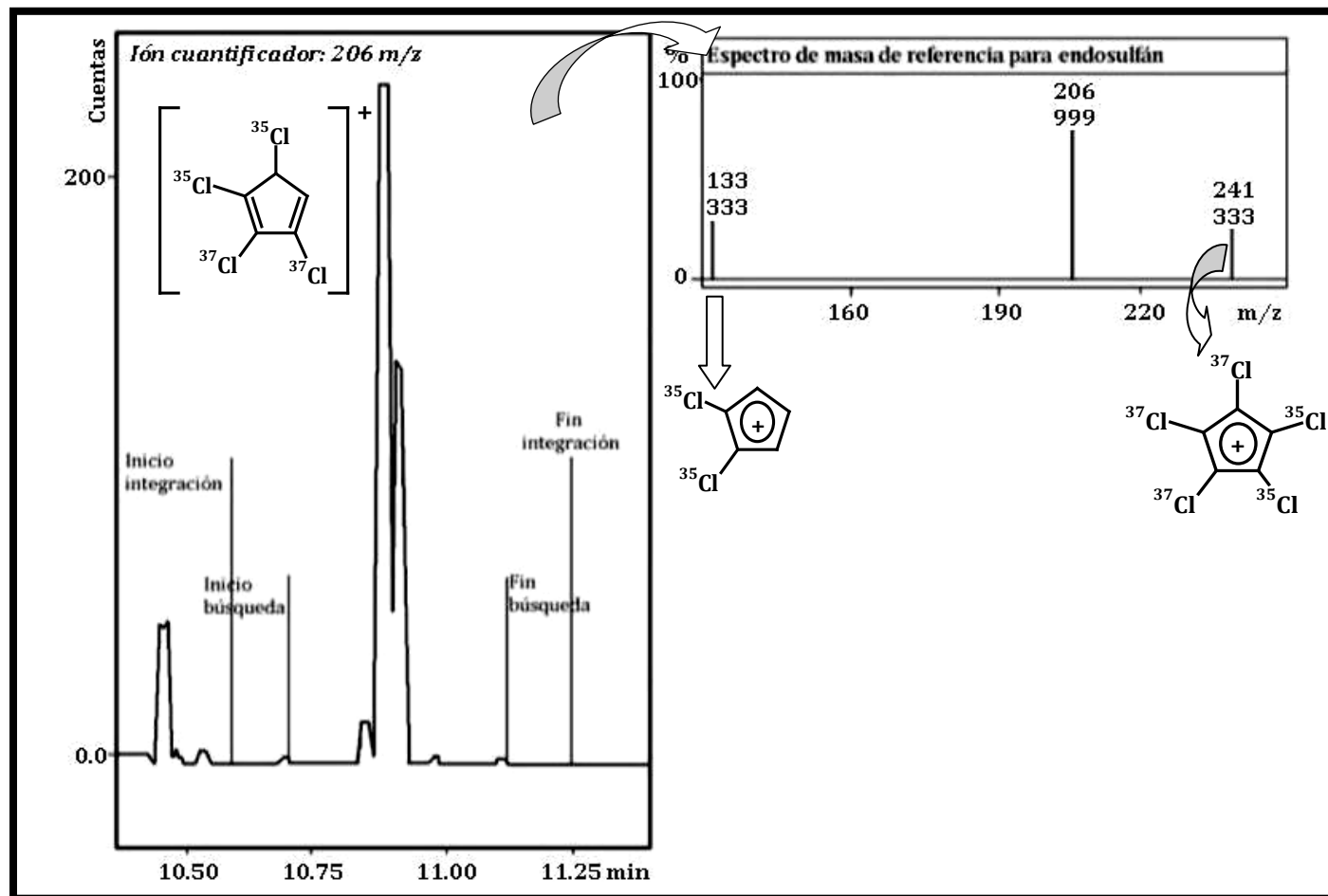
Cromatograma y espectro de masa/masa de la tetrahidroftalimida (THFI), mostrando los iones cuantificador y calificador resultado del re-cálculo de las soluciones de trabajo STB (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm con 0.5 ppm de cafeína)



Cromatograma y espectro de masa/masa del carbofurán, mostrando los iones cuantificador y calificador resultado del recálculo de las soluciones de trabajo STB (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm con 0.5 ppm de cafeína)

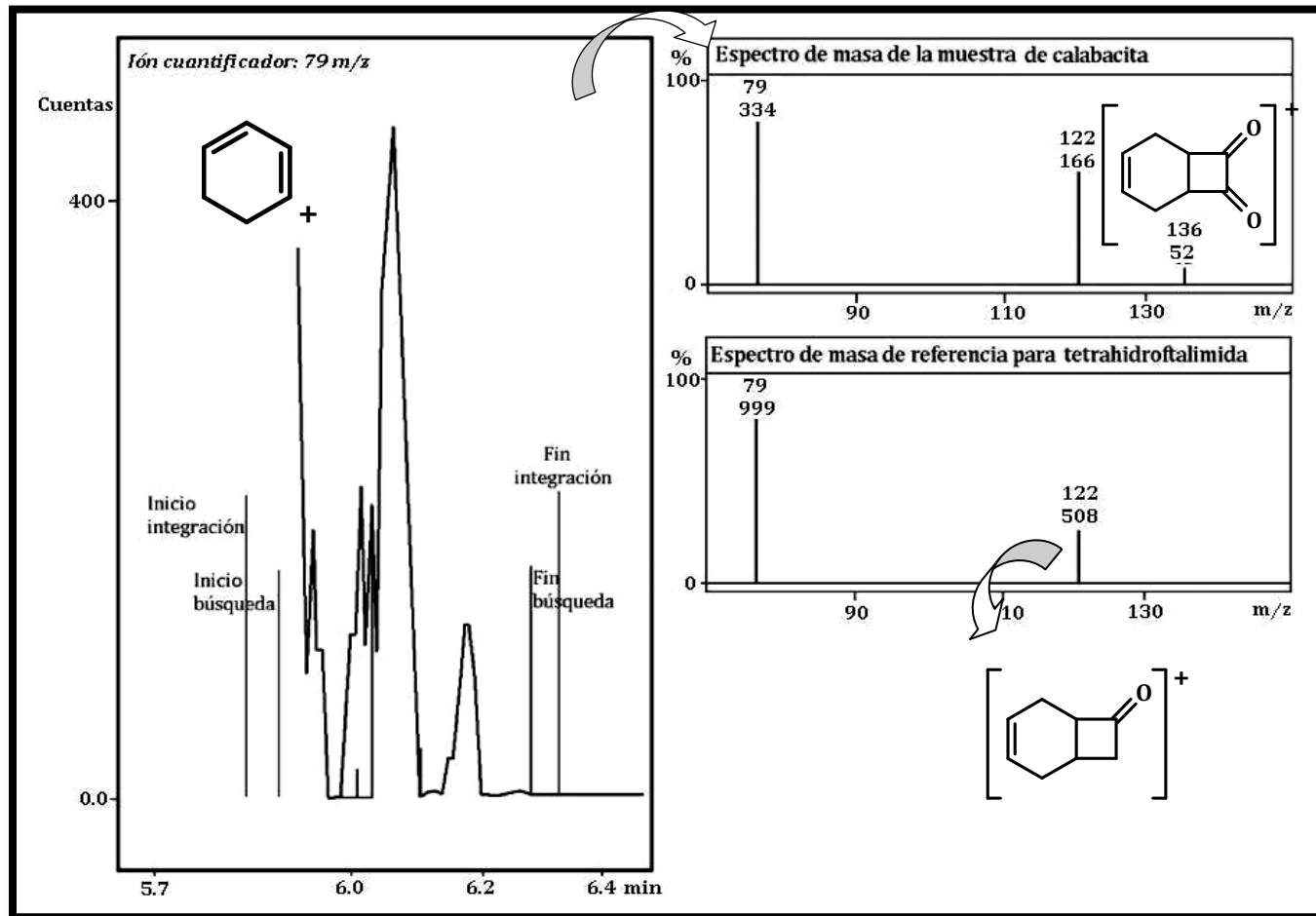


Cromatograma y espectro de masa/masa del malatión, mostrando los iones cuantificador y calificador resultado del recálculo de las soluciones de trabajo STB (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm con 0.5 ppm de cafeína)

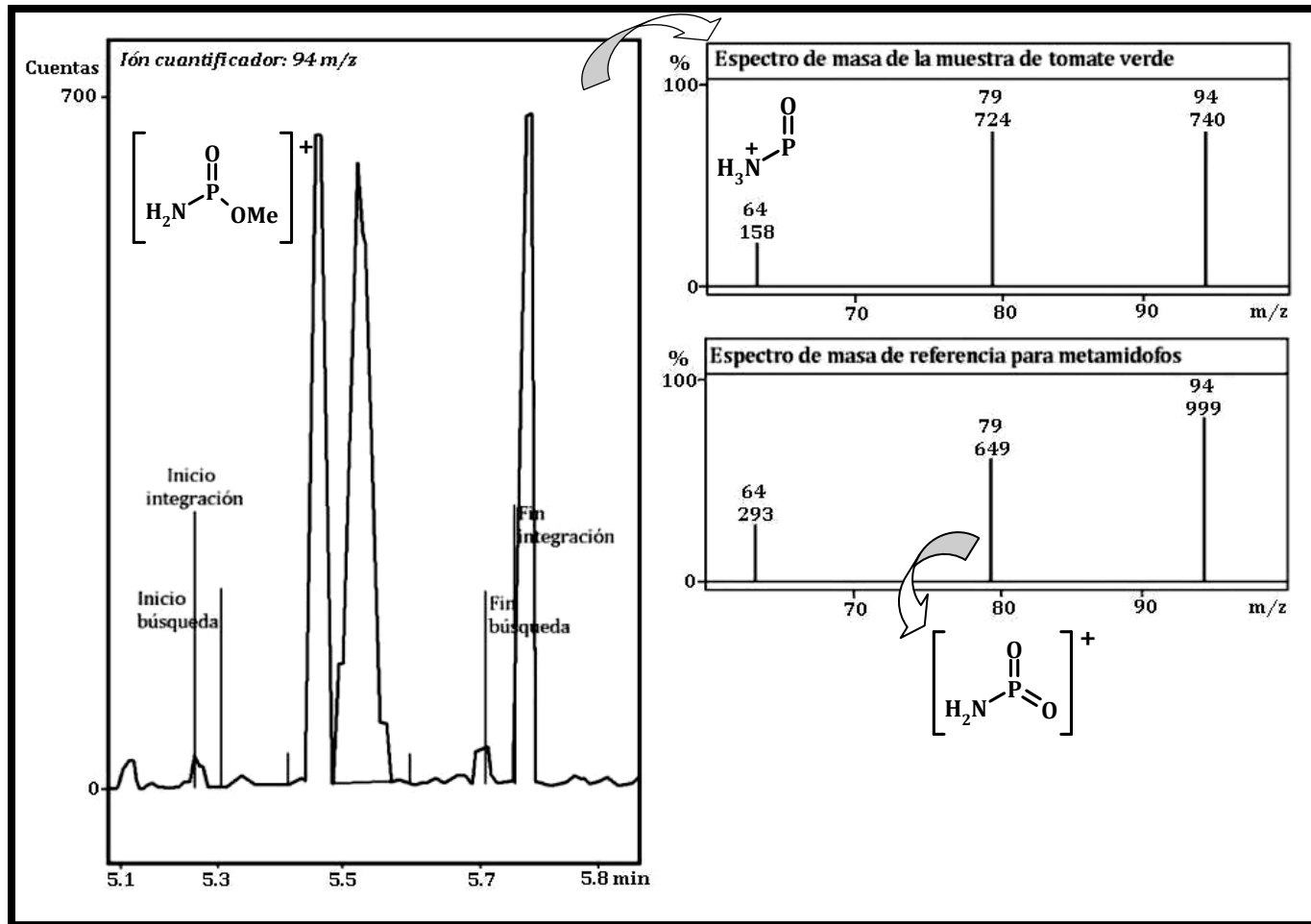


Cromatograma y espectro de masa/masa del alfa-endosulfán, mostrando los iones cuantificador y calificadoros resultado del re-cálculo de las soluciones de trabajo STB (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm con 0.5 ppm de cafeína)

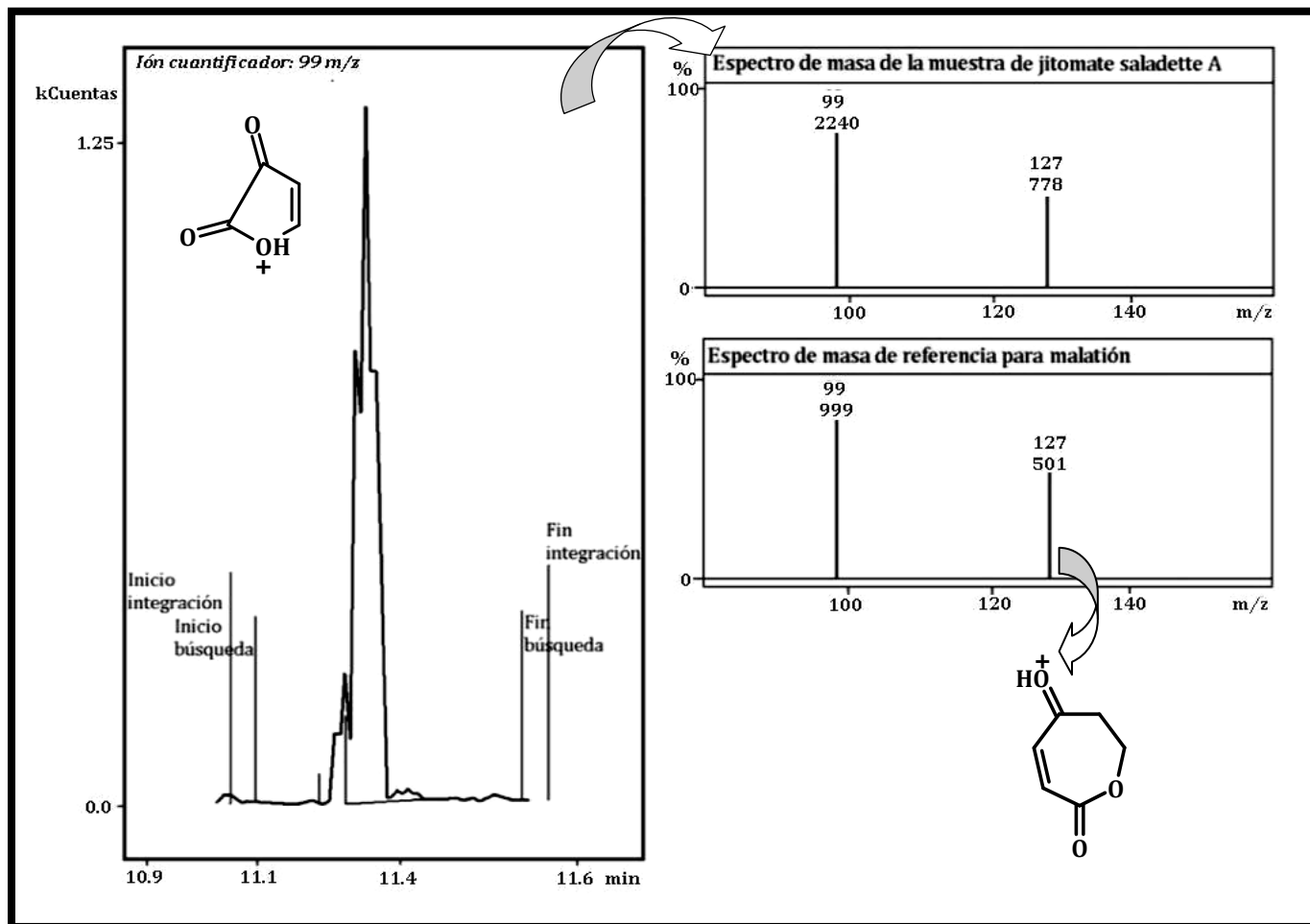
APÉNDICE 2. Cromatogramas y espectros de masa/masa de los pesticidas en los vegetales estudiados



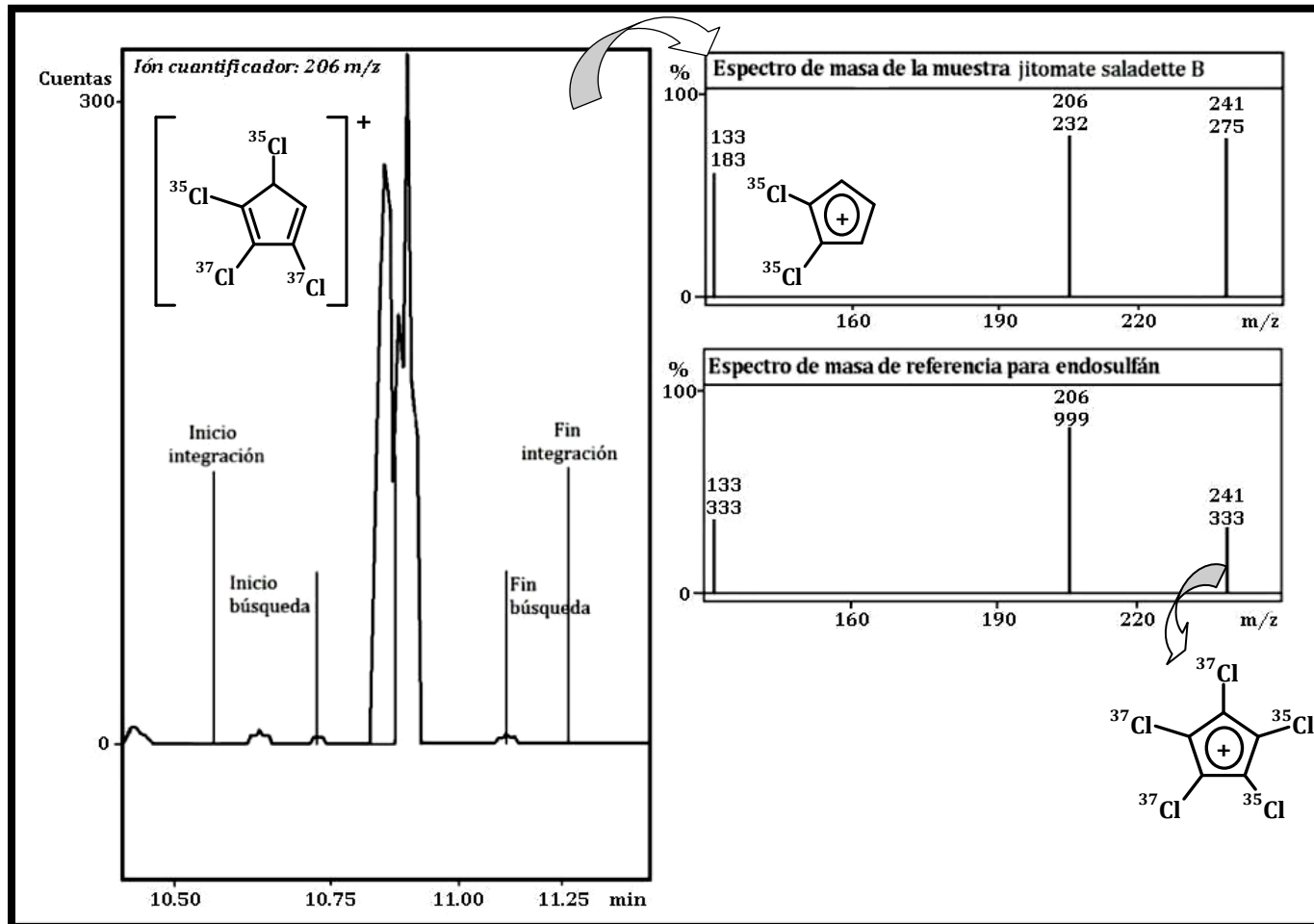
Cromatograma y espectro de masa/masa de la tetrahidroftalimida (THFI), mostrando los iones cuantificador y calificador en la calabacita (CAL)



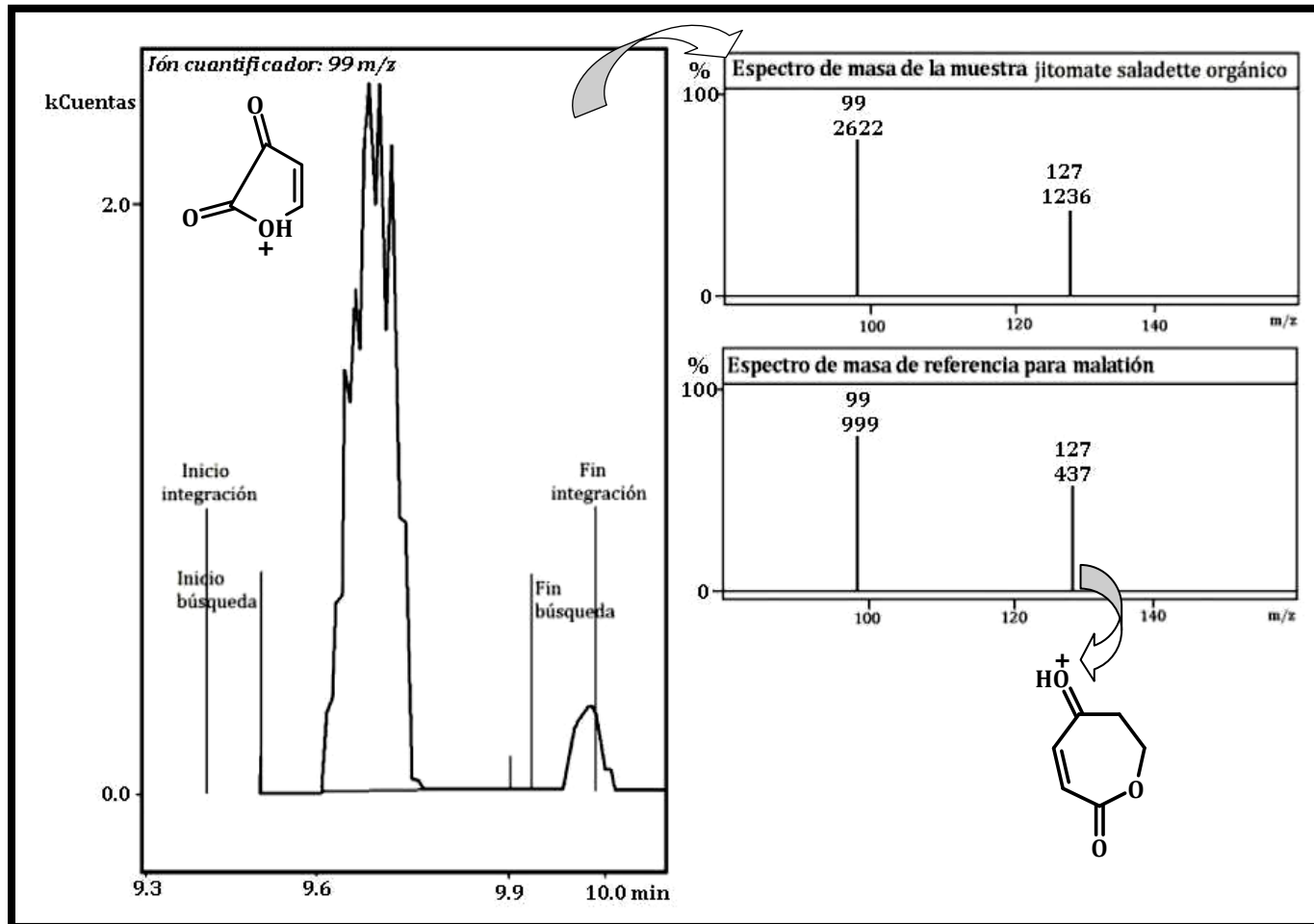
Cromatograma y espectro de masa/masa del metamidofos, mostrando los iones cuantificador y calificador en el tomate verde (TV)



Cromatograma y espectro de masa/masa del malatión, mostrando los iones cuantificador y calificador en el jitomate saladette A



Cromatograma y espectro de masa/masa del alfa-endosulfán, mostrando los iones cuantificador y calificador en el jitomate saladette B



Cromatograma y espectro de masa/masa del malatión, mostrando los iones cuantificador y calificador en el jitomate saladette orgánico

10. ANEXOS

ANEXO 1. Propiedades de disolventes empleados comúnmente en el análisis de residuos de pesticidas a 20-25°C

<i>Disolvente</i>	<i>Polaridad</i>	<i>Solubilidad en agua (%, p/p)</i>	<i>Densidad (g/mL)</i>	<i>Punto de ebullición (°C)</i>
Agua	10.2	-	0.998	100.0
Acetonitrilo	5.8	100	0.786	81.6
Acetona	5.1	100	0.791	56.2
Metanol	5.2	100	0.792	64.6
Etanol	5.2	100	0.789	78.4
Acetato de etilo	4.4	8.7	0.902	77.2
Diclorometano	3.1	1.6	1.33	40.7
Ciclohexano	0.2	0.006	0.789	80.7
Hexano	0.0	0.014	0.660	69.0

Krynitsky, A. J.; Lehotay, S. J., 2003

El punto de ebullición es una medida de la volatilidad del disolvente y da una idea de cómo el disolvente puede evaporarse en los pasos de concentración. La densidad indica si el solvente formará la capa superior o inferior en los procedimientos de separación. La solubilidad en el agua indica si la separación líquido-líquido puede realizarse para pesticidas con agua. Es esencial empatar la polaridad del disolvente con la solubilidad del analito (Krynitsky, A. J.; Lehotay, S. J., 2003).

ANEXO 2. Columnas capilares y empacadas

Tabla I. Clasificación de columnas capilares según la inmovilización de la fase estacionaria*

<i>Nombre</i>	<i>Características de la fase estacionaria</i>
WCOT	Consiste en una película de material recubriendo la superficie interior de la columna (columna abierta de pared recubierta)
SCOT	Posee partículas de soporte en su pared, son las que se recubren con la fase líquida. Aumentan la capacidad de la columna (columna abierta de soporte recubierto)
PLOT	Tiene una fina capa de un polímero poroso depositado en su superficie interna (columna abierta de capa porosa)

* Rubinson, K. A.; Rubinson, J. F. 2001.

Tanto las columnas WCOT como las SCOT son columnas para la cromatografía de gas-líquido. Las columnas SCOT se emplean más extensamente que las WCOT por su mayor capacidad. Las columnas PLOT se utilizan en cromatografía de gas-sólido.

Tabla II. Comparación entre características de columnas empacadas y de columnas capilares*

<i>Característica</i>	<i>Columna empacadas</i>	<i>Columnas WCOT y SCOT</i>	<i>Columnas PLOT</i>
d. i. de columna (mm)	3-6	0.10-0.53	0.32-0.53
Longitud de columna (m)	1-3	30-50	30-50
Espesor de recubrimiento (µm)	---	0.1-0.5	12-25
Capacidad total (µg/componente)	100	0.05-5	0.05-5
Superficie de la fase estacionaria (m ²)	0.2	10 ⁻⁶ -10 ⁻⁷	10 ⁻⁶ -10 ⁻⁷
Caudal (mL/min)	20-100	0.5-5	5-10
Flujo lineal (cm/s)	10-50	20-50	50-100

* Rubinson, K. A.; Rubinson, J. F. 2001.