

**IMPLEMENTACIÓN DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA LA
DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PESTICIDAS EN MORA CASTILLA
(*Rubus Glaucus* Benth)**

FREYS JULIO SERRANO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2012**

**IMPLEMENTACIÓN DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA LA
DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PESTICIDAS EN MORA CASTILLA
(*rubus glaucus* Benth)**

FREYS JULIO SERRANO

**Proyecto de investigación para
optar al título de magister en química**

Directores:

**ELENA STASHENKO, Química, Ph.D
JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, Químico, Ph.D**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2012**

DEDICATORIA

*A Dios por protegerme y darme
felicidad en mi corazón, salud y
vitalidad para enfrentar los retos
diarios que la vida cruzó en mi
camino. A mi familia por ser mi
apoyo incondicional*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de una manera especial y particular a cada una de las personas que contribuyeron de alguna manera a la culminación de esta etapa de mi vida.

A la doctora Elena E. Stashenko y al doctor Jairo René Martínez, por creer en mí, darme la oportunidad de tener una excelente formación profesional. Por sus consejos que siempre buscan hacer de uno una mejor persona.

A todos los integrantes del Laboratorio de Cromatografía y Cenivam.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	23
1. MARCO TEÓRICO	25
1.1 Clorpirifos	29
1.2 Clorotalonil	30
1.3 Tebuconazol	31
1.4 Dimetoato	31
1.5 Imidacloprid	32
1.6 Benomil	33
1.7 Carbendazim	33
1.8 Mancozeb	34
1.9 Propineb	34
1.2. MORA (<i>RUBUS GLAUCUS</i> BENTH)	35
1.3. DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA	36
1.4. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS	37
1.5. ANÁLISIS INSTRUMENTAL	39
1.5.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA	39
1.5.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES	40
1.5.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS)	40
1.6. FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO	41
1.7. CIENCIOMETRÍA	42
2. METODOLOGÍA	45
2.1 REACTIVOS, SOLVENTES Y MATERIAL DE LABORATORIO	45
2.1.1 Material de referencia certificado	45
2.1.2 Material de laboratorio	46
2.2 OBTENCIÓN DE LA MATRIZ BAJO ESTUDIO	46
2.3 ETAPAS DEL PROYECTO	47
2.4 SELECCIÓN DE LA TÉCNICA CROMATOGRÁFICA	48
2.5 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS	48

2.5.1 Cromatografía de gases	48
2.5.2 Cromatografía líquida	49
2.6 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS PESTICIDAS	50
2.6.1 Determinación	50
2.6.2 Cuantificación	50
2.7 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS DE MÉRITO	51
2.7.1 Exactitud	51
2.7.2 Precisión	51
2.7.2.1 Repetibilidad	51
2.7.2.2 Reproducibilidad	52
2.7.3 Especificidad	52
2.7.4 Nivel mínimo de detección (NMD)	52
2.7.5 Nivel mínimo de cuantificación (NMC)	53
2.7.6 Rango dinámico lineal	53
2.8 EVALUACIÓN DE LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	53
3. DETERMINACIÓN DE DIMETOATO, CLOROTALONIL, CLORPIRIFOS Y TEBUCONAZOL: ANÁLISIS DE RESULTADOS	56
3.1 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR GC-ECD	56
3.1.1 Determinación	56
3.1.2 Cuantificación	56
3.1.3 Parámetros de eficiencia de la separación	59
3.2 FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO PARA GC-ECD	59
3.2.1 Evaluación de la repetibilidad del método cromatográfico para tiempos de retención (t_R) y áreas	59
3.2.2 Evaluación del RDL y de la sensibilidad del método	60
3.2.3 Determinación de los niveles mínimos de detección (NMD) y cuantificación (NMC)	61
3.2.4 Exactitud del método	62
3.2.5 Determinación de la reproducibilidad de la extracción	63
3.3 EXTRACCIÓN DE PESTICIDAS EN MUESTRAS DE MORA	63

3.4 ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS	66
4. DETERMINACIÓN DE CARBENDAZIM, IMIDACLOPRID Y BENOMIL: DESARROLLO EXPERIMENTAL	68
4.1 MÉTODO CROMATOGRÁFICO	68
4.1.1 Selección de la fase móvil	68
4.1.2 Selección de la longitud de onda	72
4.2 PARÁMETROS DE EFICIENCIA DE LA SEPARACIÓN	75
4.3 FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO PARA HPLC/DAD	76
4.3.1 Evaluación de la repetibilidad del método cromatográfico para tiempos de retención (t_R) y áreas	76
4.3.2 Evaluación del RDL y de la sensibilidad del método	77
4.3.3 Determinación de los niveles mínimos de detección (NMD) y cuantificación (NMC)	78
4.3.4 Exactitud del método	78
4.3.5 Determinación de la reproducibilidad de la extracción	79
4.4 EXTRACCIÓN DE PESTICIDAS EN MUESTRAS COMERCIALES	80
5. DETERMINACIÓN DE MANCOZEB Y PROPINEB: DESARROLLO EXPERIMENTAL	87
5.1 DERIVATIZACIÓN DEL MANCOZEB Y EL PROPINEB	87
5.1.1 Análisis del derivado	87
5.2 MÉTODO CROMATOGRÁFICO	88
5.2.1 Selección de la fase móvil	89
5.2.2 Selección de la longitud de onda	91
5.4 PARÁMETROS DE EFICIENCIA DE LA SEPARACIÓN	93
5.5 FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO PARA HPLC/DAD	94
5.5.1 Evaluación de la repetibilidad del método cromatográfico para tiempos de retención (t_R) y áreas	94
5.5.2 Evaluación del RDL y de la sensibilidad del método	95
5.5.3 Determinación de los niveles mínimos de detección (NMD) y	96

cuantificación (NMC)	
5.5.4 Exactitud del método	97
5.5.5 Determinación de la reproducibilidad de la extracción	98
5.6 EXTRACCIÓN DE PESTICIDAS EN MUESTRAS	98
COMERCIALES	
CONCLUSIONES	102
RECOMENDACIONES	104
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
ANEXOS	129

LISTADO DE TABLAS

		pág.
Tabla 1.	Compuestos y técnicas instrumentales utilizadas.	38
Tabla 2.	Especificaciones de las sustancias de referencia certificadas	45
Tabla 3.	Clasificación de los pesticidas según la técnica cromatográfica a aplicar.	48
Tabla 4.	Rango de concentraciones utilizadas para el análisis de los pesticidas.	50
Tabla 5.	Curvas de calibración del dimetoato, clorotalonil, clorpirifos y tebuconazol.	58
Tabla 6.	Parámetros de eficiencia de la separación	59
Tabla 7.	Tiempo de retención de los pesticidas.	60
Tabla 8.	Áreas de los pesticidas	60
Tabla 9.	Ecuación de la curva de calibración; Coeficiente de determinación, R^2 , pendiente y desviación estándar de la pendiente, obtenidas en la determinación simultánea de 4 pesticidas, a partir de la curva de calibración (10 – 2.200 ppb), por GC-ECD.	61
Tabla 10.	Niveles mínimos de detección y de cuantificación de los pesticidas	62
Tabla 11.	Porcentaje de recuperación de la mezcla de pesticidas adicionada a dos muestras de moras sin pesticidas.	63
Tabla 12.	Iones seleccionados de los pesticidas.	67
Tabla 13.	Concentración de dimetoato clorotalonil, clorpirifos y tebuconazol ($\mu\text{g/g}$) obtenido en las muestras de moras analizadas Vs niveles mínimos residuales permitidos.	67
Tabla 14.	Composiciones de la fase móvil examinadas para la determinación de imidacloprid y carbendazim	68
Tabla 15.	Composiciones de la fase móvil examinadas para la	70

	determinación del benomil	
Tabla 16.	Selección de longitud de onda para los pesticidas analizados.	73
Tabla 17.	Parámetros cromatográficos empleados en el presente trabajo para el análisis de imidacloprid, carbendazim y benomil por HPLC/DAD.	74
Tabla 18.	Parámetros de eficiencia de la separación de los pesticidas analizados	76
Tabla 19.	Repetibilidad de los t_R de los pesticidas analizados por HPLC/DAD.	76
Tabla 20.	Repetibilidad de áreas de picos de los pesticidas analizados por HPLC/DAD.	77
Tabla 21.	Ecuación de la curva de calibración; Coeficiente de determinación, R^2 , pendiente y desviación estándar de la pendiente, obtenidos en la determinación de los pesticidas a partir de la curva de calibración (200 – 2000 ppb) para el imidacloprid y el carbendazim y (400 – 5000 ppb) para el benomil, por HPLC/DAD.	78
Tabla 22.	Niveles mínimos de detección y de cuantificación del DAD de los pesticidas imidacloprid, carbendazim y benomil.	79
Tabla 23.	Porcentaje de recuperación de la mezcla de pesticidas adicionada a dos muestras de moras sin pesticidas.	79
Tabla 24.	Reproducibilidad de la extracción para el análisis de una muestra de mora enriquecida.	80
Tabla 25.	Concentración de imidacloprid, carbendazim y benomil ($\mu\text{g/g}$) en las muestras de mora analizadas y niveles mínimos residuales permitidos (NMR).	85
Tabla 26.	Evaluación de la fase móvil para la determinación	89

	mancozeb y propineb.	
Tabla 27.	Parámetros cromatográficos empleados en el presente trabajo para el análisis de mancozeb y propineb por HPLC/DAD.	92
Tabla 28.	Eficiencia de la separación de los pesticidas analizados.	94
Tabla 29.	Repetibilidad de los t_R de los pesticidas analizados por HPLC/DAD.	94
Tabla 30.	Repetibilidad de las áreas cromatográficas de los picos para los pesticidas analizados por HPLC/DAD.	95
Tabla 31.	Ecuaciones de la curva de calibración; Coeficientes de determinación, R^2 , pendiente y desviaciones estándar de la pendiente, obtenidos en la determinación de los pesticidas a partir de la curva de calibración (10 – 2000 ppb) para el mancozeb y el propineb, por HPLC/DAD.	96
Tabla 32.	Niveles mínimos de detección y de cuantificación del DAD de los pesticidas mancozeb y propineb	96
Tabla 33.	Porcentaje de recuperación de la mezcla de pesticidas adicionada a tres muestras de moras sin pesticidas.	97
Tabla 34.	Reproducibilidad de la extracción para el análisis de una muestra de mora enriquecida.	98
Tabla 35.	Concentración de mancozeb y propineb ($\mu\text{g/g}$) obtenido en las muestras de moras analizadas <i>versus</i> niveles mínimos residuales permitidos.	100

LISTADO DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Pesticidas analizados en el presente proyecto de investigación.	28
Figura 2.	Síntesis del benomil.	32
Figura 3.	Mora castilla (<i>Rubus glaucus</i> Benth)	34
Figura 4.	Procedimiento general de MSPD.	37
Figura 5.	Número de registros sobre pesticidas en frutas, según áreas de aplicación. Fuente: base de datos <i>Scopus</i> . Periodo de observación: de 1997 - 2011. Fecha de consulta: 01/07/2011. Ecuación de búsqueda <i>TITLE-ABS-KEY (pesticide fruit)</i> .	43
Figura 6.	Número de publicaciones sobre pesticidas y frutas, según los años. Fuente: base de datos <i>Scopus</i> . Periodo de observación: de 1997 - 2011. Fecha de consulta: 01/07/2011. Ecuación de búsqueda <i>TITLE-ABS-KEY (pesticide fruit)</i> .	43
Figura 7.	Número de publicaciones sobre la técnica MDSP, según los años. Fuente: base de datos <i>Scopus</i> . Periodo de observación: de 1997 - 2011. Fecha de consulta: 04/13/2012. Ecuación de búsqueda <i>ALL(matrix dispersion solid phase)</i> .	44
Figura 8.	Columna de la técnica MDSP.	55
Figura 9.	Cromatograma obtenido en el GC-ECD, del a. dimetoato, b. clorotalonil, c. clorpirifos y d. tebuconazol.	57
Figura 10.	Perfil cromatográfico del extracto de mora M1 para la determinación de dimetoato, clorotalonil, clorpirifos y tebuconazol; analizados por GC-ECD. Columna DB-5 [5%fenil-poli(dimetilsiloxano), 30m x 0,25mm x 0,25µm].	64
Figura 11.	Perfil cromatográfico del extracto de mora M2 para la determinación de dimetoato, clorotalonil, clorpirifos y tebuconazol; analizados por GC-ECD. Columna DB-5	65

- [5%fenil-poli(dimetilsiloxano), 30m x 0,25mm x 0,25µm].
- Figura 12.** Perfil cromatográfico del extracto de mora M3 para la 66
determinación de dimetoato, clorotalonil, clorpirifos y
tebuconazol; analizados por GC-ECD. Columna DB-5
[5%fenil-poli(dimetilsiloxano), 30m x 0,25mm x 0,25µm].
- Figura 13.** Cromatogramas obtenidos de los ensayos realizados 69
utilizando las fases móviles de la **Tabla 14**, columna Zorbax
C18 RP, solución stock de imidacloprid y carbendazim de 1
ppm.
- Figura 14.** Degradación del benomil en solventes orgánicos a 70
temperatura ambiente.
- Figura 15.** Cromatograma obtenido del ensayo a (**Tabla 18**), mrc de 71
benomil de 1 ppm, columna Zorbax C18 RP. Comparado con
el mrc de carbendazim.
- Figura 16.** Cromatogramas obtenidos de los ensayos realizados de la 71
Tabla 15, mrc de benomil de 1 ppm, columna Zorbax C18
RP.
- Figura 17.** Espectros ultravioleta-visible de: a. imidacloprid, b. 72
carbendazim.
- Figura 18.** Espectro ultravioleta-visible del benomil. 73
- Figura 19.** Perfil cromatográfico del imidacloprid y carbendazim 74
obtenido por HPLC – DAD. Columna Zorbax C₁₈ RP. Mezcla
de pesticidas de 1 µg/mL.
- Figura 20.** Perfil cromatográfico del benomil obtenido por HPLC – DAD. 75
Columna Zorbax C₁₈ RP. Concentración, 1 µg/mL.
- Figura 21.** Perfiles cromatográficos del extracto de mora M1 para la 81
determinación de **a.** imidacloprid (270nm) y **b.** carbendazim
(288 nm); analizados por HPLC-DAD. Columna Zorbax
Eclipse XDB-C18.
- Figura 22.** Perfiles cromatográficos del extracto de mora M2 para la 82

- determinación de **a.** imidacloprid (270nm) y **b.** carbendazim (288 nm); analizados por HPLC-DAD. Columna Zorbax Eclipse XDB-C18.
- Figura 23.** Perfiles cromatográficos del extracto de mora M3 para la 83
determinación de **a.** imidacloprid (270nm) y **b.** carbendazim (288 nm); analizados por HPLC-DAD. Columna Zorbax Eclipse XDB-C18.
- Figura 24.** Perfil cromatográfico del benomil (288nm) en la muestra de 84
mora M1, analizada por HPLC-DAD. Columna Zorbax Eclipse XDB-C18.
- Figura 25.** Perfil cromatográfico de benomil (288nm) en la muestra de 84
mora M2, analizada por HPLC-DAD. Columna Zorbax Eclipse XDB-C18.
- Figura 26.** Perfil cromatográfico del benomil en la muestra de mora M3, 85
analizada por HPLC-DAD. Columna Zorbax Eclipse XDB-C18.
- Figura 27.** Espectro de masas del derivado del mancozeb. Columna 87
DB-5 de 30m x 0,25mm x 0,25µm, *splitless* pulsado, modo *full scan* (40 - 300 *m/z*)
- Figura 28.** Espectro de masas del derivado del propineb. Columna DB-5 88
de 30m x 0,25mm x 0,25µm, *splitless* pulsado, modo *full scan* (40 - 300 *m/z*)
- Figura 29.** Cromatogramas obtenidos de los ensayos realizados, 89
utilizando las fases móviles de la **Tabla 26**, columna Zorbax C18 RP; solución stock de mancozeb y propineb de 1 ppm.
- Figura 30.** Espectro ultravioleta-visible obtenido en un cromatógrafo 91
líquido AT 1200 con detector de arreglo de diodos, columna zorbax C18 RP. **a.** mancozeb **b.** propineb.
- Figura 31.** Perfil cromatográfico del mancozeb y propineb (272 nm) 93
obtenido por HPLC – DAD, Columna C₁₈ RP, utilizando las

condiciones descritas en la **Tabla 27**; Mezcla de pesticidas de 1 µg/mL.

Figura 32. Perfil cromatográfico del extracto de mora M1 (272 nm), para 99 la determinación de mancozeb y propineb, analizados por HPLC-DAD. Columna ZORBAX Eclipse XDB-C18.

Figura 33. Perfil cromatográfico del extracto de mora M2 (272 nm), para 99 la determinación de mancozeb y propineb, analizados por HPLC-DAD. Columna ZORBAX Eclipse XDB-C18.

Figura 34. Perfil cromatográfico del extracto de mora M3 (272 nm), para 100 la determinación de mancozeb y propineb, analizados por HPLC-DAD. Columna ZORBAX Eclipse XDB-C18.

DIAGRAMAS

	Pág.
Diagrama 1. Diagrama general de las etapas del proyecto	47

LISTADO DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Curvas de calibración de dimetoato, clorotalonil, clorpirifos, tebuconazol, imidacloprid, carbendazim, benomil, mancozeb y propineb.	129
Anexo B. Espectros de masas de dimetoato, clorotalonil, clorpirifos y tebuconazol, analizado en modo <i>full scan</i> entre 40-400 <i>m/z</i>	135

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AT	Agilent Technologies
A.P.	Alta pureza
BBU	1-(2-benzimidazolil)-3-n-butilurea
ca.	Cantidad aproximada
DAD	Diode Array Detector (Detector de arreglo de diodos)
DL50	Dosis letal media
e.g.	Por ejemplo
ECD	Electron capture detector (detector de captura de electrones)
FLD	Fluorescence detector (detector de fluorescencia)
FPD	Flame Photometric Detector (detector fotométrico de llama)
GLP	Good Laboratory Practice (Buenas prácticas de laboratorio)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
LC	Liquid Chromatography (Cromatografía líquida)
LOD	Nivel mínimo de detección
MBC	Metil-N-benzimidazol-2-il-carbamato
mrc	Material de referencia certificado
MSPD	Dispersión de la matriz en fase sólida
nACh	acetilcolina
NPD	Nitrogen phosphorus detector (detector de nitrógeno y fosforo)
SPE	Solid-phase extraction

TITULO: IMPLEMENTACIÓN DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA LA DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PESTICIDAS EN MORA CASTILLA (*Rubus Glaucus Benth*) *

AUTOR: FREYS JULIO SERRANO **

PALABRAS CLAVES: implementación, métodos, cromatográficos, determinación, cuantificación, pesticidas.

CONTENIDO: En el presente proyecto se desarrollaron metodologías analíticas para la determinación de pesticidas comunes en los cultivos de mora en el departamento de Santander, a saber: dimetoato, clorotalonil, clorpirifos, tebuconazol, benomil, carbendazim, imidacloprid, mancozeb y propineb. Para la determinación de estos pesticidas se utilizaron técnicas de preparación de muestras tales como: dispersión de la matriz en fase sólida y derivatización.

La determinación de dimetoato, clorpirifos, clorotalonil y tebuconazol, se realizó usando un cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones, con niveles mínimos de detección (NMD) entre 0.01–0.15 ppb y niveles mínimos de cuantificación (NMC) entre 0.08-0.40 ppb; la metodología presentó porcentajes de recuperación entre 93 y 112%.

La determinación de carbendazim, imidacloprid y benomil, se realizó usando un cromatógrafo líquido de alta eficiencia con detector de arreglo diodos (HPLC-DAD) que permitió NMD entre 0.07-0.11 ppb y NMC entre 0.11-0.20 ppb; los porcentajes de recuperación fueron superiores al 75% para el carbendazim y el imidacloprid; en el benomil se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 64 y 67%.

El mancozeb y el propineb se derivatizaron y se analizaron utilizando HPLC-DAD, con NMD de 0.09 y 0.11 ppb, y NMC de 0.11 y 0.20 ppb respectivamente; los porcentajes de recuperación fueron superiores al 75%.

* Proyecto de Grado

** Facultad **De Ciencias**. Escuela **De Química**. Directora **Elena Stashenko, Química, Ph.D.**
Codirector **Jairo René Martínez, Químico, Ph.D**

TITLE: IMPLEMENTATION OF CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR THE IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF PESTICIDES IN MORA (*Rubus glaucus* Benth) *

AUTOR: FREYS JULIO SERRANO **

KEYWORDS: implementation, methods, chromatographic identification, quantification, pesticides.

CONTENT:

In this project analytical methodologies were developed for the determination of dimethoate, chlorothalonil, chlorpyrifos, tebuconazole, benomyl, carbendazim, imidacloprid, mancozeb and propineb. These common pesticides are used on crops of blackberry in the department of Santander. The determinations of these pesticides employed sample preparation techniques such as *matrix solid phase dispersion* and derivatization.

The determination of dimethoate, chlorpyrifos, chlorothalonil and tebuconazole was performed using a gas chromatograph with electron capture detector. Minimum detection levels (LOD) between 0.01 and 0.15 ppb and minimum quantitation levels (LOQ) between 0.08 and 0.40 ppb were achieved. The methodology presented recovery rates between 93 and 112%.

The simultaneous determination of carbendazim, imidacloprid and benomyl was performed using a high performance liquid chromatograph with diode array detector (HPLC-DAD). LOD between 0.07 and 0.11 ppb and LOQ between 0.11 and 0.20 ppb were obtained. The recoveries were higher than 75% for carbendazim and imidacloprid and 64-67% for benomyl.

Mancozeb and propineb were derivatized and analyzed by HPLC-DAD. Their LOD were found to be 0.09 and 0.11 ppb, respectively and their LOQ were determined as 0.11 and 0.20 ppb, respectively. Recoveries above 75% were obtained.

* Proyecto de Grado

** Facultad De Ciencias. Escuela De Química. Directora Elena Stashenko, Química, Ph.D.

Codirector Jairo René Martínez, Químico, Ph.D

INTRODUCCIÓN

El uso de plaguicidas ha creado beneficios en la producción agrícola a nivel mundial, pero el empleo inadecuado de los mismos, expresado en términos de tipos de plaguicida, toxicidad, número de aplicaciones y sobredosificación, ha emanado diferentes formas de contaminación ambiental que afectan los productos agrícolas por la acumulación de residuos. Éstos serían potencialmente dañinos a la salud humana y podrían incurrir negativamente en su comercialización [1].

El hombre no está exento de contaminarse, y, aunque el organismo pueda soportar algunos niveles de contaminantes, son innegables los efectos crónicos que éstos pueden producir [2]. La población más frágil es la infantil, los estudios realizados muestran que, incluso, dosis bajas de plaguicidas, afectan el desarrollo del sistema nervioso y el cerebro de niños en crecimiento [3].

En el presente trabajo, realizado en el Laboratorio de Cromatografía, se desarrollaron metodologías para la determinación de residuos de los fungicidas: benomil, carbendazim, clorpirifos, clorotalonil, imidacloprid, dimetoato, propineb, mancozeb y tebuconazol, en mora castilla, principalmente. La selección de mora (*Rubus Glaucus* Benth) se debe a los diferentes antecedentes medioambientales, sociales y de seguridad alimentaria anteriormente comentados, considerando el volumen de producción y consumo que genera esta fruta, así como la importancia económica que representa para los respectivos productores.

Se clasificaron y se determinaron estos compuestos con el fin de escoger la técnica cromatográfica más sensible para cada uno. De esta manera, para el dimetoato, el clorpirifos, el clorotalonil y el tebuconazol, se escogió el

cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones (GC-ECD), el cual presentó niveles de detección entre 0,01 – 0,15 ppb y niveles de cuantificación entre 0,08 -0,40 ppb; con la implementación de la técnica también se calculó el porcentaje de recuperación de los pesticidas que estuvo entre el 93-112 %.

Para el carbendazim, el imidacloprid y el benomil, se realizó la determinación en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD); se obtuvieron niveles mínimos de detección entre 0,07-0,11 ppb y niveles mínimos de cuantificación entre 0,11-0,20 ppb; los porcentajes de recuperación fueron superiores al 75% para el carbendazim y el imidacloprid; en el benomil se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 64-67%.

El mancozeb y el propineb no pueden ser determinados por cromatografía de gases porque estas sustancias son termolábiles y se descomponen rápidamente en el puerto de inyección. Por tal razón fue necesario derivatizarlos y determinarlos utilizando HPLC-DAD. Se obtuvieron niveles mínimos de detección del mancozeb y el propineb de 0,09 y 0,11 ppb, respectivamente, con niveles mínimos de cuantificación de 0,11 y 0,20 ppb; los porcentajes de recuperación fueron superiores al 75%.

1. MARCO TEÓRICO

Un plaguicida es una sustancia química de origen natural o sintético que se utiliza con el fin de controlar, repeler y combatir plagas que atacan a los cultivos, que, a su vez, pueden transmitir enfermedades al hombre o a los animales [1].

Los plaguicidas conforman un grupo de compuestos diversos y heterogéneos. Por tanto, existen diferentes posibilidades de clasificación.

Según el tipo de organismo que se desea controlar, los plaguicidas se dividen en [2,3]:

- Insecticidas, que atacan insectos (pulgones, minadores, taladradores, chupadores, cochinillas, etc.).
- Acaricidas, que actúan contra araña roja, ácaros varios, etc.
- Nematicidas, usados contra nemátodos.
- Moluscocidas, combaten caracoles y babosas.
- Rodenticidas, destinados a exterminar ratas, ratones y topillos.
- Fungicidas, que atacan los hongos parásitos promotores de enfermedades en los cultivos.
- Antibióticos, de uso agrícola que combaten contra las bacteriosis características de todos los cultivos.
- Desinfectantes, de suelos, cuya acción en general se extiende a hongos patógenos, insectos, malas hierbas, nemátodos, que se encuentran en los suelos destinados a los cultivos.
- Herbicidas, que ejecutan un ataque selectivo contra las malas hierbas.

De acuerdo con su forma de acción los plaguicidas también pueden clasificarse en [3]:

- Atrayentes, que por el contrario, los atraen hacia un cebo intoxicado (insecticidas: feromonas).
- Por ingestión, el plaguicida actúa al ser ingerido por el parásito (lucrados, insecticidas arsenicales, etc.).
- Repelentes, que alejan los insectos perjudiciales (insecticidas naftalinas).
- Por inhalación, el producto actúa obstaculizando la respiración del agente nocivo (fungicidas ditiocarbámicos, insecticidas organofosforados).
- Mixtos, el producto actúa por inhalación y por ingestión (insecticidas organofosforados, organoclorados, piretroides y carbamatos).
- Por contacto, el producto actúa sobre el parásito u organismo al entrar en contacto con éste (insecticidas de origen vegetal: rotenonas, piretrina y nicotina; o, de origen mineral: polisulfuros, aceites, etc.).
- Sistémicos o curativos, se emplean sobre plantas ya infectadas, penetrando en el interior de éstas e impidiendo el desarrollo del hongo (carbendazim, benomil, tiabendazol).
- Penetrantes, que combaten contra hongos de penetración incipiente o superficial (folpet, ditianona, bitertanol).
- Ovicidas o Esterilizantes, que provocan la infertilidad de huevos y puestas en los insectos, o inhiben el mecanismo sexual (acaricidas).
- Preventivos, se usan antes de que aparezca la infección, para impedir la germinación de la espora del hongo (tiram, captan, captafol, etc.).
- Larvicidas, actúa sobre larvas (acaricidas).

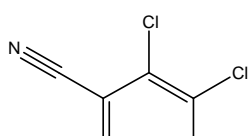
La toxicidad de los pesticidas e incluso los fungicidas presenta distintos aspectos según su distinta trascendencia. Por lo que a sus efectos más inmediatos se refiere, se consideran varias clases de toxicidad [4]:

- a. Toxicidad oral aguda. Se refiere a la ingestión de una sola vez, de un producto pesticida tóxico.
- b. Toxicidad dérmica. Se refiere a los riesgos tóxicos debidos al contacto y absorción del pesticida por la piel.
- c. Toxicidad crónica. Mediante dietas alimentarias preparadas con dosis variadas del tóxico que se estudia, se averiguan los niveles de riesgo del pesticida a través de su administración diaria a los animales.
- d. Toxicidad sub-aguda o sub-crónica. Aquí el efecto que se toma en consideración no es la muerte del animal. Puesto que las dosis administradas son más bajas que en la exposición aguda, los efectos también son menos externos y se registran todas las alteraciones producidas en todos los tejidos y fluidos corporales.

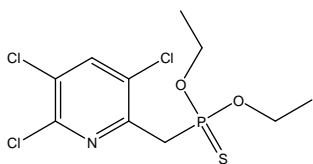
Aparte de la toxicidad, se tienen en cuenta otros riesgos, como son las reacciones inesperadas de hipersensibilidad o alergia. También en casos en los que existe un manejo negligente de los pesticidas, son frecuentes los síntomas de intoxicaciones por inhalación o por penetración en la piel, boca u ojos. Así mismo, también hay estudios que relacionan a los plaguicidas con la neurotoxicidad, la mutagénesis, la carcinogenicidad y problemas de reproducción [3].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que mientras que los efectos de la toxicidad aguda son fácilmente reconocidos, los efectos que resultan de la exposición a largo plazo a bajas dosis son, a menudo, difíciles de distinguir. En particular, los efectos de una ingestión regular de residuos de plaguicidas en alimentos son difíciles de detectar y cuantificar. Estos compuestos se comercializan como productos formulados, los cuales contienen compuestos activos, excipientes (emulsificantes, antioxidantes, coadyuvantes) y diluyentes [5].

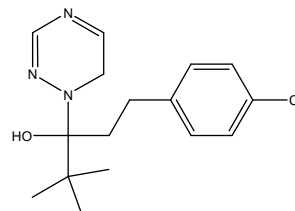
La sociedad de moreros de Santander (ASOMOREROS), sirvió de enlace con la comunidad, y, a través de encuestas, se identificaron los productos más comunes



para el control de plagas, hongos, entre otros; en total fueron 156 productos utilizados, de los cuales los compuestos activos más comunes que se hallan en estos productos son los que se presentan a continuación:

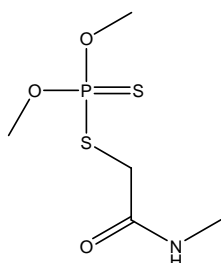


Clorpirifos

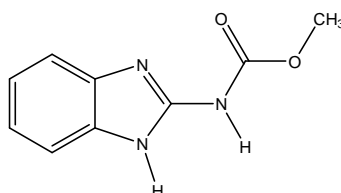


Clorotalonil

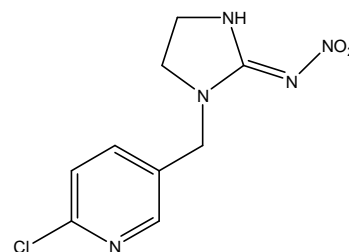
Tebuconazol



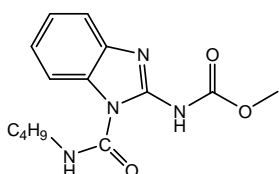
Dimetoato



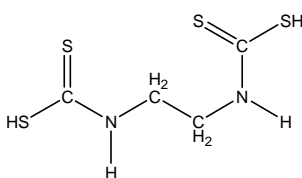
Carbendazim



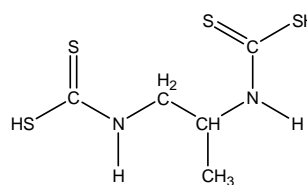
Imidacloprid



Benomil



Mancozeb



Propineb

Figura1. Pesticidas analizados en el presente proyecto de investigación.

1.1 Clorpirifos. El ácido *O,O*-dietil *O*-(3,5,6-tricloro-2-piridinil) fosforotióico es un éster que actúa como un inhibidor de la colinesterasa incluyendo la acetil colinesterasa. La inhibición de la acetil colinesterasa en el sistema nervioso central y epitelial causa la acumulación de acetilcolina, que es un neurotóxico para los animales y los humanos [6].

El clorpirifos es uno de los insecticidas más utilizados y se conoce como Lorsban y Dursban. Fue el primer pesticida registrado en 1965, se usa extensamente para el control de una variedad de plagas, como: césped e insectos de plantas ornamentales, la hormiga de fuego, cucarachas, mosquitos, entre otros [7,8]. En 1982 el uso del clorpirifos se estimó en 2,2 a 3,2 millones de kg/año, y las aplicaciones en la industria estaban entre 0,68 y 1,04 millones kg/año [9].

La degradación del clorpirifos en sustratos abióticos varía en un rango de hasta 50% en una semana, en agua de mar, y mayor del 50% en más de 24 semanas, en suelos de césped. Las bajas temperaturas reducen la actividad microbial y disminuyen el contenido orgánico [10]. Los intermedios de la degradación han sido reportados en 3-4 semanas para sedimentos y 7-6 semanas para aguas destiladas. En muestras biológicas, el tiempo es relativamente corto, menor de 9 horas en peces, aves y seres invertebrados [11].

El clorpirifos es extremadamente tóxico para algunas especies de invertebrados acuáticos y para peces teleósteos en concentraciones que varían entre 0,04 y 1,1 µg/L. La presencia de esta sustancia en el medio reduce la actividad de la colinesterasa en el cerebro, en el tejido hepático; también reduce el crecimiento, impide la reproducción e incluye la esterilidad y desarrollo anormal; durante las observaciones realizadas también se aprecia la descoordinación motriz, convulsiones y depresión en la población acuática invertebrada. Para las aves, las concentraciones letales en la dieta fueron de 30 a 50 mg de clorpirifos / kg de alimento [12,13].

1.2 Clorotalonil. El 2,4,5,6-tetracloro-isoftalonitrilo comúnmente llamado Clorotalonil, es un fungicida ftalonitrilo. Presenta una estructura química compleja con dobles enlaces, cianuros y cloros; es un compuesto moderadamente móvil en suelos arenosos; su vida media en el suelo es de 1,5 a 3 meses aproximadamente, dependiendo de la humedad y la temperatura [14]. Este fungicida se emplea a nivel agropecuario, ha sido poco estudiado desde el punto de vista toxicológico; cuando es sometido a condiciones de alta temperatura, puede liberar cianuro, el cual es un compuesto muy tóxico [14].

El clorotalonil, es un fungicida con un amplio rango de acción similar a los etilenbisditiocarbamatos y es efectivo contra la *Phytophthora* y hongos de la roya [15].

Este compuesto es estable en medio ácido y alcalino, además tiene una baja sensibilidad a la luz [16]. Por tal razón, tiene un período de acción largo como fungicida de follaje, siendo su fitotoxicidad baja. Su acción fúngica es causada probablemente por la alta reactividad de los átomos de cloro que reaccionan inmediatamente con las tio-enzimas de los hongos [17,18].

1.3 Tebuconazol. Este fungicida triazol es utilizado en la agricultura para el tratamiento de agentes patógenos y hongos en las plantas.

Aunque el departamento de alimentos y drogas de Estados Unidos considera que este fungicida es seguro para los humanos, éste puede presentar algunos riesgos. Esta sustancia está catalogada por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos como un posible agente carcinógeno y está listado como categoría C dentro de las sustancias carcinógenas. Su toxicidad es moderada, por tal razón la OMS la catalogó como categoría III en grado de toxicidad [19].

El tebuconazol fue prohibido como biocida por la Agencia Sueca de Productos Químicos y posteriormente fue aprobado por el Parlamento Europeo el 13 de enero de 2009. En estudios realizados en roedores se determinó que la absorción del tebuconazol fue completa, seguida por una rápida distribución en el cuerpo y una rápida eliminación. También se determinó que la mayor acumulación de residuos de tebuconazol en cabras y gallinas se encontraba en la excreción, en los tejidos y, para las gallinas, en los huevos [20].

1.4 Dimetoato. Este insecticida sintetizado por Cassaday en 1948 [21], tiene una solubilidad de 39 g/L, por lo tanto pertenece al grupo de los insecticidas esterfosfóricos de alta solubilidad en H₂O. Es estable en hidrólisis neutra y en ácida media, pero rápidamente saponificable en medio alcalino. En un estudio desarrollado en ratones y conejos, no se detectaron efectos tóxicos. Sin embargo se observaron defectos físicos en conejos y ratones [22].

En ratones, los resultados fueron variables en la embriotoxicidad y la teratogenicidad. Además no se encontraron efectos adversos en estudios posteriores [23-25]. En el estudio realizado por Budreau, observaron que se redujo el número de hembras gestantes; las crías presentaban bajo peso y reducción del tamaño corporal; esto fue más notorio en la segunda generación de ratones [26].

1.5 Imidacloprid. Este compuesto es el principal representante de una nueva clase de pesticidas, los insecticidas neonicotinoideos. Estos insecticidas están diseñados para actuar sobre los receptores nicotínicos, controlando las plagas sin ser tóxico en especies vertebradas. El efecto de los insecticidas neonicotinoideos sobre el sistema nervioso central de los vertebrados está más reducido por la escasa penetración de la barrera de sangre del cerebro. En estudios de actividad de control contra leptoferas, plantotoferas, mosca blanca, áfidos y varios coleópteros, se mostraron excelentes resultados [27]. En la actualidad se han

desarrollado nuevos derivados del imidacloprid tales como nitenpiran y el acetamiprid [28].

El imidacloprid muestra un mecanismo de acción sobre los receptores de la acetilcolina (nACh) y se observó una alta afinidad del enlace con los receptores nACh de los insectos [29,30] despolarizando el nervio de la membrana y causando una muerte espontánea en las cucarachas [31].

1.6 Benomil. El benomil, N-(1-butilcarbamil-benzimidazol-2-il) metilcarbamato fue sintetizado por Delp y Klopping en 1968 [32], a partir de la reacción del metil-N-benzimidazol-2-il-carbamato (MBC) con el butil isocianato. Este compuesto es prácticamente insoluble en H₂O y es hidrolizado en soluciones acuosas en MBC [33] y en soluciones alcalinas se hidroliza formando 1, 2, 3, 4 – tetrahidro – 3 – butil-2,4-dioxo [1,2a]-s-triazinbenzimidazol (STB) y 1-(2-benzimidazolil)-3-n-butilurea(BBU).

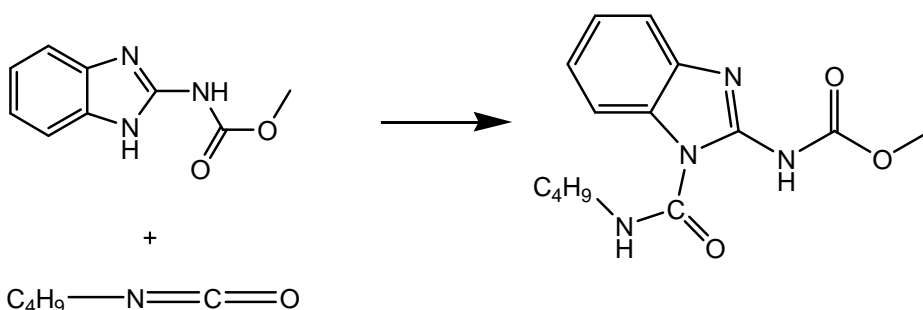


Figura 2. Síntesis del benomil.

El benomil es absorbido por la planta, la cual lo transporta en los fluidos a través de los tejidos y lo metaboliza rápidamente a MBC. Este compuesto es un fungicida sólido que está catalogado como un efectivo protectante, actuando contra *Cercospora beticola* en el azúcar y antagonista de otros agentes patógenos del tomate y el pepino; también es efectivo antagonista de *Phialosporae*, *Arthrospora*, *Symptodulosporae* y *Aleurisporae* de la clase *Deuteromycetes* [34].

1.7 Carbendazim. El carbendazim, metil-N-bencimidazol-2-il-carbamato (MBC) es un suave polvo que se descompone lentamente en soluciones alcalinas, pero es estable en soluciones ácidas [35]. Es hidrosoluble entre pH 3,3 - 8,7. Este compuesto es un fungicida de follaje con acción específica y se utiliza para proteger los alimentos por poseer un amplio espectro. Este pesticida ejerce un control rápido sobre las hojas, atacando el *Erysiphe*, *Septoriu* y el *Fusarium spp.* Pero en el tratamiento sobre cereales, decrece su efectividad en un 10% [36]. La producción sintética del carbendazim comienza a partir de la metilación de la tiourea con sulfato de dimetilo y la posterior N- acilación en medio alcalino.

1.8 Mancozeb. Este compuesto es la sal doble del manganeso y zinc del ácido N, N-etilen-bisditiocarbámico llamado mancozeb. Este compuesto es más estable que los derivados de él; esta propiedad ha sido atribuida a su estructura polimérica [37].

El mancozeb no es fitotóxico, este polímero contiene un 2% de zinc y un 20 % de manganeso. Los ditiocarbamatos no son tóxicos para las plantas, con excepción del metham y el dazomet, porque se ubican en la capa de la epidermis de las hojas, atacando los hongos y enfermedades [38].

La toxicidad directa sobre los animales es baja [39]; en estudios realizados en ratas se encontró que la dosis letal media (DL50) fue de 8,0 g/kg, el contacto directo del mancozeb durante un largo periodo de tiempo causa irritación, mientras que los vapores de esta sustancia causan conjuntivitis y bronquitis [40].

1.9 Propineb. El zinc propilen bis (ditiocarbamato) llamado propineb, es comúnmente utilizado en el área mediterránea de Europa como fungicida, principalmente por tener un amplio espectro de expansión y su acción antifúngica [41]. Generalmente el propineb es considerado de toxicidad moderada a baja, con efectos específicos giotrogénicos en ratas. En una prolongada exposición oral o

inhalación se relaciona con el cáncer, efectos teratogénicos y problemas reproductivos [42]. La neurotoxicidad del propineb, se debe principalmente a que éste es transformado en propilentiourea y disulfuro de carbono.

1.2. MORA (*RUBUS GLAUCUS* BENTH)



Clasificación científica

Reino: *Plantae*

División: *Angiospermae*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Rosales*

Familia: *Rosaceae*

Subfamilia: *Rosoideae*

Tribu: *Rubeae*

Género: *Rubus*

Subgénero: *Lampobatus*

Figura 3. Mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth)

La especie *Rubus glaucus*, (ver **Figura 3**) denominada comúnmente mora, es una planta perenne, arbustiva, semirrecta y de naturaleza trepadora. Está conformada por varios tallos que forman una corona en la base de la planta; los tallos son redondeados, espinosos y pueden crecer hasta 3 m. El fruto es una baya elipsoidal de color verde, cuando se desarrolla se torna de un color rojo y cuando madura se cambia a morado oscuro brillante [65].

La mora está formada por pequeñas drupas incrustadas a un receptáculo, que al madurar es blancuzco y carnoso. La planta crece mejor a temperaturas que varían entre 12 y 19 °C, con humedad relativa del 80 al 90 %. La producción es continua con dos picos anuales. Esta planta es originaria de las zonas altas

tropicales del noroccidente de Sudamérica y de Centroamérica, entre los 1.500 y 3.100 msnm [66-67].

En investigaciones realizadas a estas especies de *Rubus*, se ha descubierto la presencia de importantes compuestos fenólicos que pueden presentar dentro de la célula actividad antioxidante [68].

La actividad antioxidante reduce la concentración de radicales libres y en algunos casos, logra establecer grupos de quelación con iones metálicos, reduciendo la trombosis, activando macrófagos e inhibiendo la peroxidación [68].

En el departamento de Santander no se han reportado estudios de pesticidas en cultivos de mora. Este departamento es uno de los mayores productores de mora de castilla, con aproximadamente 14000 toneladas de mora por año (información suministrada por ASOMOREROS) siendo el municipio de Piedecuesta el mayor productor, con 10000 toneladas de mora por año.

1.3. DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA

Dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) es una técnica basada en *Solid-phase extraction* (SPE) en la cual una matriz es finamente triturada, dispersada y mezclada con un material adsorbente (ver **Figura 4**), (C18, alúmina, sílice, etc.). Después de mezclada la matriz con el material adsorbente a menudo es empaquetada en una minicolumna, donde los analitos son eluidos por volúmenes de solvente menores de 10 mL. La técnica MSPD emplea "co-columnas" para obtener fracciones y eliminar interferencias de la matriz. El material de la co-columna, e.g. Florisil, es embalado en el interior de la misma columna del adsorbente, limpiando la muestra con eluentes de la mezcla MSPD. Por lo general, se utiliza de 5-10 mL de solvente para realizar la extracción del analito.

En el artículo de revisión, *Matrix solid phase dispersión* [69]; Barker comenta que la mayor parte de los analitos son eluidos en los 4 primeros mL, si 0,5 g de la muestra se mezclan con 2 g del soporte sólido [70-72].

Las ventajas principales del procedimiento MSPD comparado con otras técnicas de extracción son:

1. El protocolo analítico es simplificado y acortado.
2. La posibilidad de formación de emulsión es eliminada.
3. El consumo solvente es reducido.
4. La eficacia de extracción de los analitos es mejorada porque la totalidad de la muestra es expuesta al extractante.

Otra cualidad interesante de la técnica MSPD es extraer analitos de productos alimenticios tanto sólidos como líquidos. La principal desventaja es la carencia de automatización del procedimiento [72].

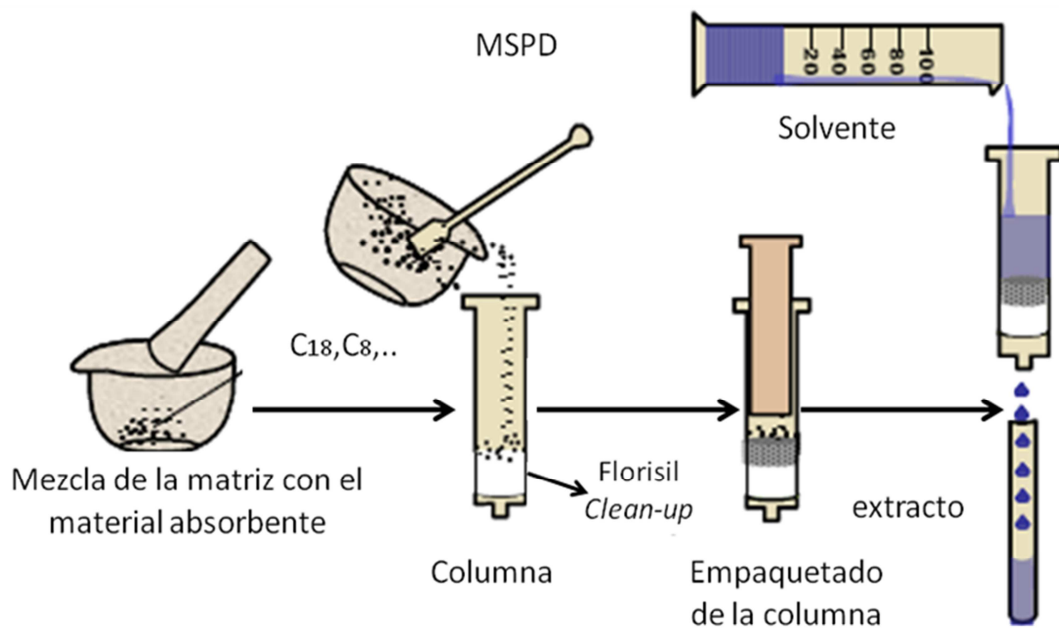


Figura 4. Procedimiento general de MSPD.

1.4. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS

Los estudios actuales que se realizan sobre estas sustancias, buscan principalmente tres aspectos tales como: determinación simultánea, rápida preparación de la muestra y una alta sensibilidad de la técnica. En la **Tabla 1**, se presenta un resumen de las técnicas utilizadas para la determinación de pesticidas.

Tabla 1. Compuestos y técnicas instrumentales utilizadas.

Compuesto	Técnica instrumental		Referencias bibliográficas
	Líquida	Gases	
Clorpirifos	HPLC-DAD, CE	GC-NPD, GC-ECD, GC -FPD	[43- 45]
Clorotalonil	HPLC-DAD	GC-ECD	[46, 47]
Dimetoato		GC-FPD, GC-NPD, GC-ECD	[48, 49]
Tebuconazol		GC-ECD, GC-NPD	[50, 51]
Imidacloprid	HPLC-DAD		[52, 53]
Carbendazim	HPLC-DAD		[54- 56]
Benomil	HPLC-FLD, HPLC-UV		[57, 58]
Mancozeb	HPLC-UV	GC-FPD	[59, 60]
Propineb	HPLC-UV		[61, 62]

Teniendo en cuenta las características fisicoquímicas de las sustancias y la sensibilidad de la técnica instrumental, se hace necesario escoger con detenimiento la metodología analítica a usar, por ejemplo: sustancias como el clorotalonil y el clorpirifos se pueden determinar por HPLC y por ECD, siendo la sensibilidad de este último, superior a la del HPLC.

En sustancias como el mancozeb y el propineb se presentan grandes dificultades para su determinación, porque estos polímeros tienen semejanzas estructurales, en muchas publicaciones los determinan como ditiocarbamatos totales [63, 64]. El *codex* alimentario recomienda determinarlo como etilenbisditiocarbamatos, utilizando la derivatización [65].

1.5. ANÁLISIS INSTRUMENTAL

1.5.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA

Este tipo de cromatografía representa una de las herramientas más empleadas en los laboratorios analíticos, debido a que permite el análisis de una extensa variedad de moléculas, de altos pesos moleculares, altos puntos de ebullición y termolábiles, principales restricciones de la cromatografía gaseosa. En HPLC, cuando se habla de cromatografía líquida en fase reversa, se refiere a que, la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. La fase estacionaria más utilizada está compuesta por octadecilsiloxano (ODS), formada por sílice a la cual se une el grupo octadecilo, un grupo no polar conformado por 18 carbonos que garantizan una superficie con características orgánicas; ésta retendrá con mayor fuerza los analitos menos polares, determinando que el orden de elución sea del más polar al menos polar; otro tipo de fase usada es la fase normal, la cual realiza la elución en orden inverso a la fase reversa, estos tipos de fase son los más utilizados en la determinación de pesticidas [73-81].

En cuanto a la fase móvil, en general, está compuesta por agua y modificadores orgánicos como acetonitrilo, metanol, tetrahidrofurano, entre otros. Éstos pueden ser utilizados cada uno por aparte o como mezclas, dando la opción de utilizar una fase móvil de composición constante (elución isocrática) o variable, con el fin de dar a la fase móvil diferentes grados de polaridad (elución en gradiente) durante el tiempo en el que eluyen los analitos; dichas mezclas pueden realizarse gracias al uso de la bomba que, además de permitir trabajar con altas presiones, se encarga de tomar diferentes solventes con proporciones predeterminadas por el analista y, luego, realizar la mezcla en una cámara especial de mezclado. Análogo a la temperatura en cromatografía de gases, la variación de la composición de la fase móvil a lo largo de la separación, es uno de los parámetros que se aplican para mejorar la eficiencia del cromatógrafo [77-87].

En la detección de los analitos, los detectores utilizados en HPLC deben ser instrumentos capaces de medir una propiedad diferencial entre un líquido (fase móvil) y un sólido (analitos disueltos). Uno de los detectores más utilizado es el de arreglo de diodos Ultravioleta-Visible (DAD UV-Vis). Este tipo de detector mide la absorbancia del analito. Además, posee buena sensibilidad y rango lineal, que permite detectar analitos en el orden de los nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradiente de solventes. Este detector admite trabajar en el rango aproximado entre 350-700 nm, y permite obtener tanto el respectivo cromatograma, como el espectro UV-Vis de cada uno de los picos observados en el cromatograma [78-81].

1.5.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES

Cromatografía de gases (GC) es la técnica analítica más común para la determinación de contaminantes orgánicos en muestras acuosas y no acuosas. En análisis ambiental se requieren límites de detección muy bajos para la determinación de contaminantes a nivel de trazas. La detección tan sensible se puede obtener por concentración de la muestra, seguida de una limpieza para remover las sustancias interferentes. Es importante conocer el tipo de compuestos a ser analizados, así como ciertas propiedades físicas y químicas de estos compuestos, para seleccionar la clase de detector y columna que se deben usar en el análisis [73, 82,83].

1.5.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS)

La espectrometría de masas es un método de análisis rápido y sensible que permite obtener la máxima cantidad de información estructural con la cantidad mínima de muestra (10^{-6} - 10^{-14} g).

El espectro de masas es una gráfica que relaciona las masas de los iones específicos (más exactamente, valores de la relación masa/carga del ion, m/z) con sus respectivas abundancias en la corriente iónica total (TIC) producida por la ionización y la fragmentación de las moléculas del analito en la cámara de ionización. El espectro de masas suministra información sobre la masa molecular, composición elemental de una sustancia (cuando se utiliza MS de alta resolución) y en algunos casos, permite establecer la estructura espacial de la molécula [74, 75,78].

1.6. FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO

Es una herramienta compuesta por una serie de parámetros que permiten verificar la fiabilidad y validez de una metodología implementada. Una vez desarrollado un método de análisis por HPLC, al igual que toda técnica analítica, deberá validarse, es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados producidos, son confiables.

Evidentemente, todo nuevo método analítico debe validarse para demostrar su idoneidad. En un ensayo de validación deben como mínimo considerarse los siguientes parámetros [84-87]:

- Especificidad
- Exactitud
- Precisión
- Nivel mínimo de detección
- Nivel mínimo de cuantificación
- Rango dinámico lineal
- Estabilidad

Al obtener estos valores podemos establecer la confianza de los resultados emitidos de la metodología Implementada; realizando los ajustes sobre los valores obtenidos en la muestra y presentando su desviación.

1.7. CIENCIOMETRÍA

Este instrumento permite cuantificar la actividad científica. Los análisis bibliométricos evalúan a la ciencia como una disciplina o actividad económica, los resultados obtenidos permiten analizar, evaluar y trazar las políticas desde una perspectiva económica y social. Algunos de los elementos utilizados para realizar la bibliometría son las bases de datos de artículos y patentes [88,89].

Con el objetivo de analizar el estado actual de las investigaciones acerca de los pesticidas utilizados en cultivos de mora, se realizó un estudio bibliométrico de la producción científica existente, utilizando la base de datos, *Scopus*.

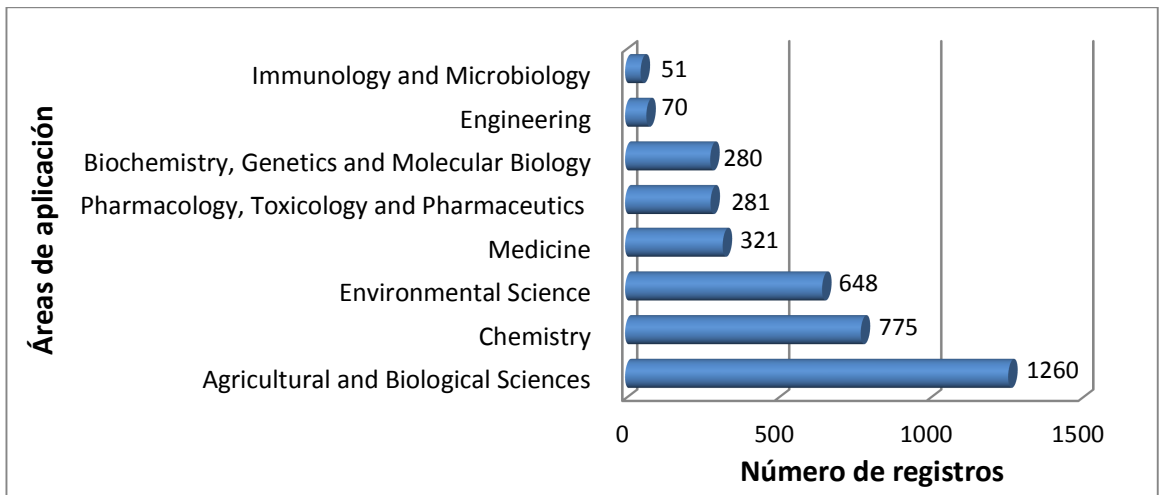


Figura 5. Número de registros sobre pesticidas en frutas, según áreas de aplicación. Fuente: base de datos *Scopus*. Periodo de observación: de 1997 - 2011. Fecha de consulta: 01/07/2011. Ecuación de búsqueda *TITLE-ABS-KEY (pesticide fruit)*.

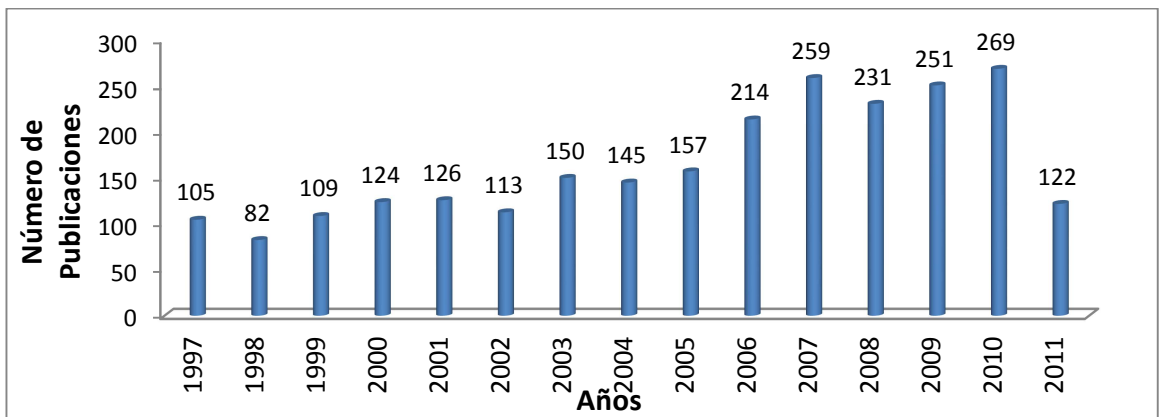


Figura 6. Número de publicaciones sobre pesticidas y frutas, según los años. Fuente: base de datos *Scopus*. Periodo de observación: de 1997 - 2011. Fecha de consulta: 01/07/2011. Ecuación de búsqueda *TITLE-ABS-KEY(pesticide fruit)*.

En la **Figura 5** se observa que *Agricultural and Biological Science* es el área de aplicación en donde participa este proyecto; actualmente presenta 1260 registros sobre pesticidas y frutas, en un periodo de observación 1997-2011 y en la **Figura 6**, se ve un aumento en el número de publicaciones a través de los años en pesticidas y frutas, mostrando el interés mundial respecto a este tema.

El interés a nivel mundial en investigaciones sobre frutas y pesticidas da a este trabajo la posibilidad de ser avalado por parte de la comunidad científica y de ser publicado en revistas como *agricultural and biological science*.

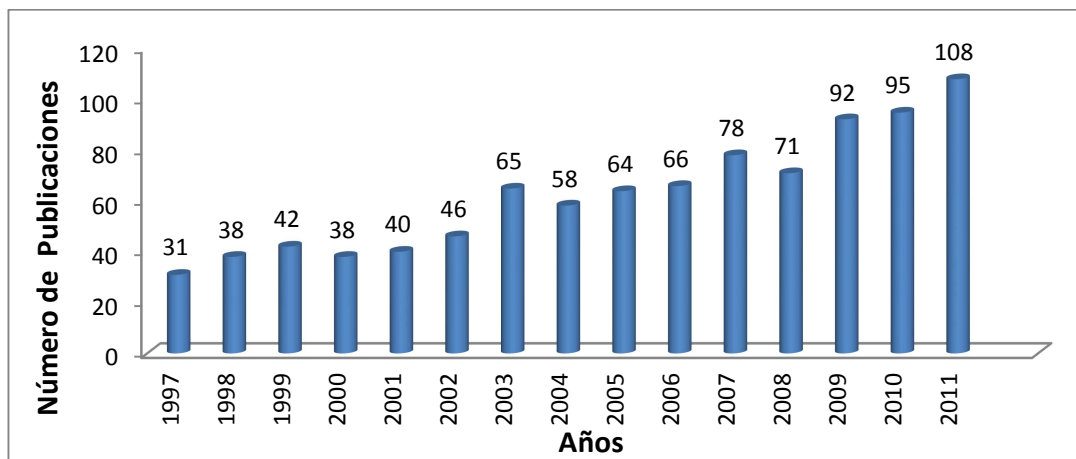


Figura 7. Número de publicaciones sobre la técnica MSPD, según los años. Fuente: base de datos *Scopus*. Periodo de observación: de 1997 - 2011. Fecha de consulta: 04/13/2012. Ecuación de búsqueda *ALL(matrix dispersion solid phase)*.

También se realizó la consulta sobre la técnica MSPD **Figura 7**, en esta figura se observa un aumento en el número de publicaciones a través de los años en esta técnica, mostrando el interés mundial respecto a este tema lo que permite que este trabajo este a la vanguardia en la comunidad científica.

2. METODOLOGÍA

2.1 REACTIVOS, SOLVENTES Y MATERIAL DE LABORATORIO

Para la realización de este trabajo, se emplearon los siguientes reactivos: Acetonitrilo: Merck, *Suprasolv* ref. 1.00017.2500, Lot. I458617-843. Columna C18 RP: Merck, *Lichrolut* RP-18 (40-63 µm) ref. 1.02122.0001, Lot. K91328922. Sulfato de sodio: Merck, ref. 31481, Lot. 43360. Florisil®, 60-100 Mesh: ref. F1108, Lot YJ0691. Agua *milliQ*, metanol: JT Baker, grado HPLC, Ref. 9093, Lot. J15C01. Amoniacó solución 25 %: Merck, Ref. 1.05432.2500, Lot. K34562232. HCL 37%: Merck Ref. 1.00317.2500, Lot. K37471017, Ácido orto fosfórico: Sigma – Aldrich, ref. 30417, lot. 43500. Sulfato de dimetilo: Merck, ref. 8.03071.0500, Lot. S6041471. EDTA L-cisteína: Sigma, ref. C-7880, Lot. 118F0078.

2.1.1 Material de referencia certificado (mrc). En la **Tabla 2** se muestran las sustancias de referencia certificadas, empleadas en este estudio.

Tabla 2. Especificaciones de las sustancias de referencia certificadas.

Sustancia	CAS Nº	Pureza (%)	Nº de Lote	Fabricante
Dimetoato	60-51-5	98	70927	Dr Ehrenstofer
Clorpirifos	2921-88-2	99,5	80711	Dr Ehrenstofer
Clorotalonil	1897-45-6	97,5	70918	Dr Ehrenstofer
Tebuconazol	107534-96-3	98,8	80418	Dr Ehrenstofer

Continuación **Tabla 2.**

Sustancia	CAS N°	Pureza (%)	N° de Lote	Fabricante
Carbendazim	10605-21-7	99	80820	Dr Ehrenstofer
Benomil	17804-35-2	98	71105	Dr Ehrenstofer
mancozeb	8018-01-7	73,5	90728	Dr Ehrenstofer
propineb	12071-83-9	80	80718	Dr Ehrenstofer

2.1.2 Material de laboratorio. Se utilizaron los siguientes materiales de laboratorio: balanza analítica AG 285 de Mettler Toledo (Schwerzenbach, Suiza), balones aforados de 2 mL, balones de 25 mL esmerilado 24/40, refrigerantes con esmerilado 24/40, vasos de precipitado de 100 mL y tubos de ensayos de Schott (Texas, EE.UU.), micropipetas de 2-20, 25-250, 100-1000 μ L, puntas plásticas para micro-pipetas, tubos cónicos de poli(propileno) de 1,5 mL de Brand (Wertheim, Alemania), magnetos de 1 cm, jeringas plásticas, filtros de membrana PVDF de 0,45 μ m de Millipore (Sao Paulo, Brasil), microjeringa para inyección de 50 μ L de Agilent Technologies (Melbourne, Australia).

2.2 OBTENCIÓN DE LA MATRIZ BAJO ESTUDIO.

En Bucaramanga existen 7 plazas de mercado en las que se comercializa la mora de castilla. Se realizó un muestreo aleatorio simple en tres de ellas, comprando 3 libras de mora en puestos de venta distintos; posteriormente en el laboratorio se seleccionaron solamente las moras sanas (aquellas que no estaban aplastadas) y maduras (aquellas que presentaban un color morado brillante y el pedúnculo debe desprenderse con facilidad).

2.3 ETAPAS DEL PROYECTO.

A continuación se presenta el **Diagrama 1** del proyecto. Para la implementación de los métodos fue necesario seleccionar la técnica cromatográfica más adecuada y sensible, determinar las figuras analíticas de mérito, establecer las condiciones de extracción y finalmente aplicarlo a muestras de mora adquiridas en mercados locales.



Diagrama 1. Diagrama general de las etapas del proyecto

2.4 SELECCIÓN DE LA TÉCNICA CROMATOGRÁFICA

En la **Tabla 3** se observa la clasificación realizada según la técnica cromatográfica a emplear, la cual se construyó teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas: temperatura de ebullición y temperatura de descomposición.

Tabla 3. Clasificación de los pesticidas según la técnica cromatográfica a aplicar.

Pesticida	Técnica cromatográfica
Dimetoato	GC- ECD
Clorpirifos	
Clorotalonil	
Tebuconazol	
Imidacloprid	HPLC-DAD
Carbendazim	
Benomil	
Mancozeb	Derivatización
Propineb	HPLC-DAD

2.5 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS

2.5.1 Cromatografía de gases La determinación de dimetoato, clorotalonil, clorpirifos y tebuconazol presentes en la mora, se realizó en un cromatógrafo de gases HP 6890 plus con programación electrónica de presión, dotado de un micro-detector de captura de electrones (μ - ECD, ^{63}Ni), un inyector automático HP 7683, un puerto de inyección *split/splitless* y un sistema de datos ChemStation Rev. B.04.02.

Se utilizó una columna DB-5 (*J & WScientific, Folsom, CA, EE.UU.*) [5%fenil-poli(dimetilsiloxano), 30m x 0,25mm x 0,25µm] Las temperaturas del inyector y del detector permanecieron a 250 y 300°C respectivamente, la programación de temperatura de la columna fue así: 100°C (3 min) hasta 200°C 4°C/min (10 min) hasta 280°C 10°C/min (10 min) Como gas de arrastre se utilizó helio (99.995 %, Linde) a un flujo volumétrico de 2,0 mL/min, modo *splitless* y como gas auxiliar argón/metano.

La confirmación de los analitos de interés: dimetoato, clorotalonil, clorpirifos y tebuconazol, se realizó usando un cromatógrafo de gases (GC) HP 5890 Series II (*Hewlett-Packard, Palo Alto, California, EE.UU.*), acoplado a un detector selectivo de masas (MS) HP-5972 operado en modo de barrido completo de radiofrecuencias (*full scan*) y monitoreo de ion(es) seleccionado(s). Inyector automático HP-7683, puerto de inyección *split/splitless*, sistema de datos HP *ChemStation D.02.05*. Se empleó una columna DB-5 de 30 m x 25 mm, recubierta con una fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano) de 0,25 µm de espesor. La programación de temperatura de la columna fue así: 100°C (3 min) hasta 200°C (10 min) 4°C/min hasta 280°C (10 min) 10°C/min. Como gas de arrastre se utilizó helio (99.995 %, Linde) a un flujo volumétrico de 2,0 mL/min, modo *splitless*. el detector operó en modo *full scan* en un rango de 40-400 *m/z*. Para el análisis del derivado se cambió el modo de inyección al modo *splitless* pulsado.

2.5.2 Cromatografía líquida La determinación cromatográfica de carbendazim, imidacloprid y benomil presentes en la mora, se realizó en un cromatógrafo líquido AT 1200 Series (*Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE.UU.*), que consta de una bomba cuaternaria AT G1354A, un inyector manual AT Series 1200 G1328B y un detector UV-Vis de arreglo de diodos (DAD) G1315B, con una columna AT apolar ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4,6 mm x 150 mm x 5 µm). El

procesamiento de los datos se realizó a través del *software Agilent ChemStation* LC versión B.04.02.

2.6 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS PESTICIDAS

6.6.1 Determinación. Se realizó comparando los tiempos de retención de los picos cromatográficos correspondientes a cada uno de los pesticidas de referencia, con los tiempos de retención de los picos cromatográficos observados en los cromatogramas obtenidos de la muestra, bajo las mismas condiciones.

2.6.2 Cuantificación. Se construyeron las curvas de calibración para cada uno de los pesticidas de referencia en determinado rango de concentraciones (**Tabla 4**), teniendo en cuenta el factor de respuesta del equipo y su linealidad. De esta forma se construyó un modelo matemático (regresión lineal) mediante el cual se pudieron inferir las concentraciones.

Tabla 4. Rangos de concentraciones utilizadas para el análisis de los pesticidas.

Pesticida	Concentración ppb
Mancozeb	0,005 – 2,000
Benomil	0,400 – 5,000

Continuación **Tabla 4.**

Pesticida	Concentración ppb
Carbendazim	0,200 – 2,000
Clorpirifos	0,012 – 2,400
Clorotalonil	0,011 – 2,200
Imidacloprid	0,200 – 2,000
Dimetoato	0,013 – 2,600
Propineb	0,050 – 2,000
Tebuconazol	0,110 – 2,400

2.7 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO

Las figuras analíticas de mérito que se evaluaron con el método implementado fueron: exactitud, precisión, nivel mínimo de detección, nivel mínimo de cuantificación, y rango dinámico lineal.

2.7.1 Exactitud: La matriz de mora se enriqueció con una mezcla de pesticidas a una concentración conocida y se le realizó el proceso de extracción implementado para determinar el porcentaje de recuperación.

2.7.2 Precisión: La evaluación de la precisión se enfocó en dos de los tres aspectos que la componen; estos son:

2.7.2.1 Repetibilidad: se determinó a partir de tres mediciones de las concentraciones de pesticidas en el procedimiento, bajo las mismas condiciones y se determinó la desviación estándar.

2.7.2.2 Reproducibilidad: Se evaluó usando los resultados del experimento llevado a cabo reproduciendo el experimento original (siguiendo la misma metodología de preparación de la muestra) al día siguiente.

2.7.3 Especificidad: Para determinar específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes que estén en la muestra, se midió la eficiencia del cromatógrafo, la separación (la resolución) y el factor *tailing* (coleo) a partir de los platos teóricos.

2.7.4 nivel mínimo de detección (NMD) A partir de la señal analítica más pequeña discernible, y_L , que se midió y no correspondió a una fluctuación aleatoria de la medida del blanco, y_B , dependiendo de a cuantas unidades de desviación estándar del blanco (S_B) está y_L de $\overline{y_B}$ (promedio de las medidas del blanco) y para establecer el NMD, se determina que:

$$y_L = \overline{y_B} + kS_B \quad \text{(Ecuación. 1)}$$

Donde k es un valor que se elige de acuerdo con el nivel de confianza que se desee; en este caso se utilizó $k=3$ (nivel de confianza de la detección de 95%). La concentración límite es una función de y_L y por lo tanto:

$$NMD = \frac{(y_L - \overline{y_B})}{m} \quad \text{(Ecuación. 2)}$$

Sustituyendo la ecuación (1) en la (2) se obtiene que:

$$NMD = \frac{kS_B}{m} \quad \text{(Ecuación. 3)}$$

Por lo tanto el límite de detección se encontró dividiendo kS_B por la pendiente obtenida por regresión de la curva de calibración.

2.7.5 nivel mínimo de cuantificación El nivel mínimo de cuantificación (NMC) se definió para un valor de $k=10$ y se reemplazó en la **ecuación 4** [90].

$$NMC = \frac{kS_B}{m} \quad (\text{Ecuación. 4})$$

2.7.6 Rango dinámico lineal Se determinó el rango en el cual los resultados son linealmente proporcionales a la concentración de analito presente en la muestra.

2.8 EVALUACIÓN DE LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

Para la determinación simultánea de los pesticidas: dimetoato, clorotalonil, clorpirifos, tebuconazol, imidacloprid, benomil y carbendazim; se seleccionó la técnica MDSP propuesta por Barker [69-71] por ser rápida, de alto porcentaje de recuperación y amigable con el ambiente; sin embargo, debido al alto contenido de agua, se realizaron algunas modificaciones como el uso del sulfato de sodio anhidro y el florisil.

Se pesaron ca. 0,6 g de muestra y se mezclaron con 0,5 g de C18. Posteriormente en el cartucho se adicionaron primero florisil 0,7 g luego sulfato de sodio anhidro 0,5 g y finalmente la mezcla mora-C18.

Para el empaquetamiento se reutilizaron las fritas originales de las columnas (ver **Figura 8**). Como fase móvil se utilizó acetonitrilo grado pestanal 8 mL, posteriormente se concentró con nitrógeno A.P. hasta 1 mL y el extracto obtenido se inyectó en el cromatógrafo.

En la extracción del benomil, una vez se obtuvieron los 8 mL de solución de acetonitrilo – analito se realizó un ajuste del pH entre 3-4, luego se concentró con nitrógeno A.P. hasta 1 mL y el extracto obtenido se inyectó en el cromatógrafo.

Para la determinación del mancozeb y el propineb no se pudo aplicar la metodología antes descrita porque que estos compuestos forman grandes complejos órgano-metálicos, estos complejos son insolubles en solventes orgánicos, lo que imposibilita su extracción con la técnica MDSP; y, si se desean analizar es necesario realizar un ataque al enlace órgano metálico y posteriormente derivatizar el ditiocarbamato.

Para la obtención de los derivados se pesó 1 mg de mancozeb al igual que de propineb y se realizó la derivatización usando la metodología reportada por Kawamoto Tatsuhiko *et ál.* [92]. A 1 mg del pesticida se adicionaron 2 mL de una solución de EDTA - L-cisteína (15 g de EDTA y 10 g de L-cisteína disueltos en 100 mL de H₂O a un pH ajustado de 9,5 - 10 con una solución de NaOH 10 M). Se agitó durante 30 min, luego se ajustó el pH a 7-7,5 con HCl 2M y se adicionaron 50 µL de sulfato de dimetilo; por último se dejó reaccionar durante 20 min.

Posteriormente se realizó la extracción líquido –líquido con acetonitrilo 3 x 2 mL, luego se concentró con nitrógeno a 1 mL, finalmente el extracto fue filtrado con un filtro de 0,45 µm e inyectado al HPLC-DAD.

En la preparación de la muestra para la determinación del mancozeb y propineb se pesaron 0,6 g de mora y se siguió la metodología de derivatización presentada.

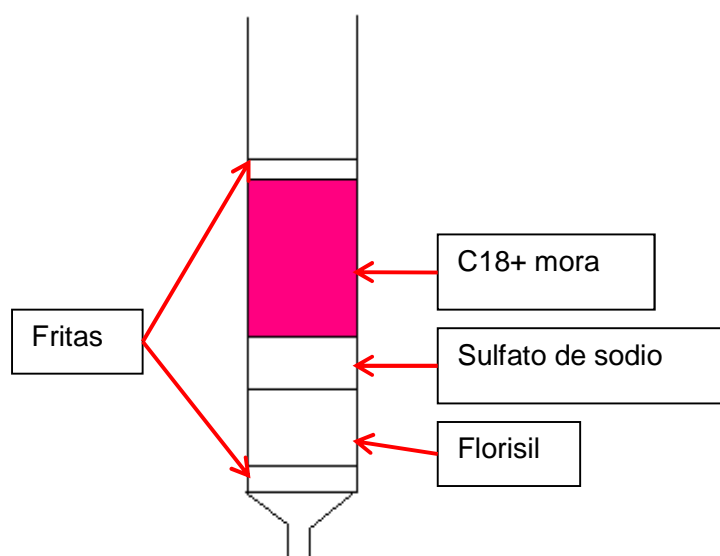


Figura 8. Columna de la técnica MDSP.

3. DETERMINACIÓN DE DIMETOATO, CLOROTALONIL, CLORPIRIFOS Y TEBUCONAZOL: ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR GC-ECD

Se realizó la determinación y cuantificación por GC-ECD de los pesticidas dimetoato clorotalonil, clorpirifos y tebuconazol en muestras de mora adquiridas en el mercado local.

3.1.1 Determinación. Se realizó comparando los t_R de los picos cromatográficos correspondientes a cada una de los pesticidas de referencia, con los de los picos cromatográficos observados en los cromatogramas obtenidos de los extractos de las matrices, analizadas bajo las mismas condiciones cromatográficas.

3.1.2 Cuantificación. Para la cuantificación de cada uno de los pesticidas en las muestras de mora analizadas, se empleó la técnica de estandarización externa. Para ello, se utilizó el factor de respuesta (R_f) establecido del análisis de las soluciones patrón de pesticidas en diferentes concentraciones (ver **Figura 9, Tabla 5**).

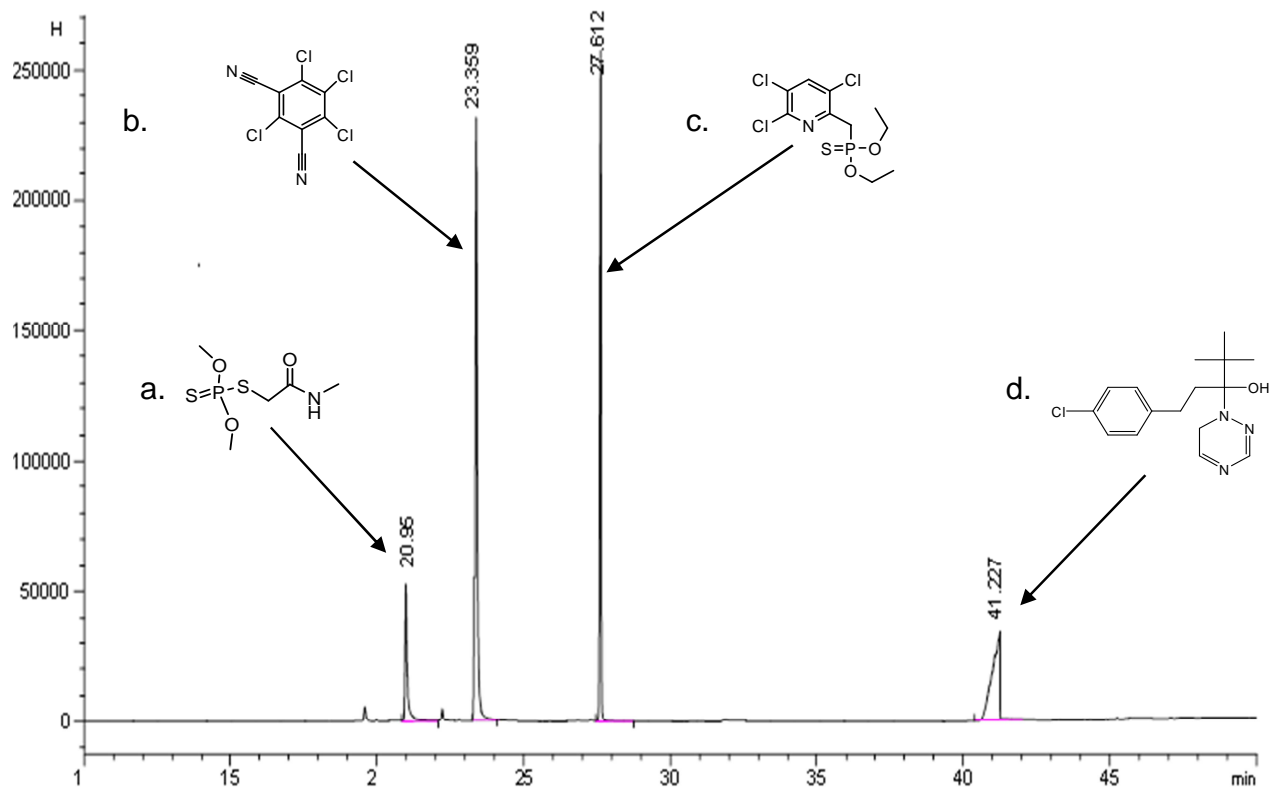


Figura 9. Cromatograma obtenido en el cromatógrafo de gases HP 6890, dotado de un micro-detector de captura de electrones, de una solución de 10 ppm de a. dimetoato, b. clorotalonil, c. clorpirifos y d. tebuconazol en acetonitrilo. Columna DB-5 (*J & WScientific, Folsom, CA, EE.UU.*) [5%fenil-poli(dimetilsiloxano), 30m x 0,25mm x 0,25µm].

Tabla 5. Datos para las curvas de calibración del dimetoato, clorotalonil, clorpirifos y tebuconazol.

Dimetoato		Clorotalonil		Clorpirifos		Tebuconazol	
Concentración (µg/mL) de las soluciones de trabajo	Áreas de respuesta	Concentración (µg/mL) de las soluciones de trabajo	Áreas de respuesta	Concentración (µg/mL) de las soluciones de trabajo	Áreas de respuesta	Concentración (µg/mL) de las soluciones de trabajo	Áreas de respuesta
0,013	147	0,011	500	0,012	2243	0,110	153
0,013	152	0,011	421	0,012	2295	0,110	155
0,130	3655	0,110	23714	0,120	22301	0,275	328
0,130	4156	0,110	25406	0,120	22323	0,275	330
0,130	3990	0,110	25608	0,300	53605	0,550	482
0,650	26200	0,275	60100	0,300	54900	0,825	759
0,975	41694	0,550	167000	0,600	108000	0,825	759
1,300	59841	0,825	256425	0,900	161814	1,100	941
2,600	123668	1,100	354066	1,200	214443	1,100	934
		2,200	744718	2,400	438712	2,200	1853

3.1.3 Parámetros de eficiencia de la separación. En la **Tabla 6** se reportan los parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica, determinados bajo las condiciones de operación establecidas y calculadas.

Como valor de α se encuentra entre $1 < \alpha < 2$ se dice que tiene una buena separación cromatográfica, además el valor de la resolución es mayor a 1,5 lo que confirma que se obtuvieron picos bien delimitados.

Tabla 6. Parámetros de eficiencia de la separación

Pesticidas	t_R , min	W_b , min	N^*	k^*	α^*	R_s^*
Dimetoato	20,964	0,0628	1785796	18,1985	-	-
Clorotalonil	22,026	0,0584	2273273	19,1706	1,1	17,5
Clorpirifos	27,602	0,0538	4218059	24,2769	1,3	99,4
Tebuconazol	40,631	0,1038	2449429	36,2075	1,5	165,3

* N: Número de platos teóricos; k' : Factor de retención; α : Factor de selectividad; R_s : Resolución.

3.2 FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO PARA GC-ECD

3.2.1 Evaluación de la repetibilidad del método cromatográfico para tiempos de retención (t_R) y áreas. Se inyectó tres veces una mezcla de los pesticidas dimetoato, clorotalonil, clorpirifos y tebuconazol (2 μ L, 1 ppm), para determinar la repetibilidad del método. Los resultados de la evaluación de la repetibilidad de t_R y áreas de los picos cromatográficos, se observan en las **Tablas 7 y 8**, respectivamente.

En las **Tablas 7 y 8** se observa que los coeficientes de variación, CV, no superaron el 5% para la medición de áreas y t_R , y figuran por lo tanto dentro de lo recomendado por las GLP (*Good Laboratory Practice*) [84].

Tabla 7. Tiempo de retención de los pesticidas.

Pesticidas	t_R , min			S	\bar{X}	CV %
	1	2	3			
Dimetoato	20,382	20,380	20,383	0,002	20,382	0,007
Clorotalonil	22,726	22,723	22,725	0,002	22,725	0,007
Clorpirifos	26,986	26,987	26,988	0,001	26,987	0,004
Tebuconazol	39,823	39,823	39,814	0,005	39,820	0,013

Tabla 8. Áreas de los pesticidas

Pesticidas	[] $\mu\text{g/mL}^*$	Áreas			S	\bar{X}	CV %
		1	2	3			
Dimetoato	1,3	55200	57535	59841	2300	58000	4,0
Clorotalonil	1,1	344000	354066	367876	12000	360000	3,4
Clorpirifos	1,2	211000	214443	220587	4900	215000	2,3
Tebuconazol	1,1	902	941	934	21	930	2,2

*concentración

3.2.2 Evaluación del RDL y de la sensibilidad del método. El RDL y la sensibilidad se determinaron con base en los datos obtenidos de la curva de calibración, para cada uno de los 4 pesticidas analizados (ver **Anexo 1**). En la **Tabla 9**, se muestra, para cada pesticida, la ecuación de la curva de calibración, el coeficiente de determinación, R^2 , que mide el ajuste de la curva para el rango de concentraciones evaluado (10– 2.200 ppb); la

pendiente de la curva (factor de respuesta, R_f) y la desviación estándar de la pendiente (evaluando, el área de respuesta), miden la sensibilidad del método.

Tabla 9. Ecuación de la curva de calibración; Coeficiente de determinación, R^2 , pendiente y desviación estándar de la pendiente, obtenidas en la determinación simultánea de 4 pesticidas, a partir de la curva de calibración (10– 2.200 ppb), por GC-ECD.

Pesticidas	Ecuación	R	R_f	S_{Rf}	$R_f \pm tS_{Rf}$
Dimetoato	$y = 47601x - 2363$	0,998	47601	1665	48000 ± 1300
Clorotalonil	$y = 340771x - 14881$	0,998	340771	9476	340000 ± 7700
Clorpirifos	$y = 182022x - 494,2$	0,999	182022	1356	182000 ± 1100
Tebuconazol	$y = 801,2x + 78,90$	0,997	801	23	801 ± 18

R_f : Pendiente S_{Rf} : Desviación estándar de la pendiente t: 2,57 para un 95% de confianza.

En la **Tabla 9**, se observa que el coeficiente de determinación R^2 se encuentra entre 0,997-0,999, para las curvas de calibración obtenidas en el rango evaluado, lo que indica un buen ajuste de los parámetros. Por tanto, el RDL del método implementado fue de 10 – 2.200 ppb. La sensibilidad del método se determinó como la pendiente de la curva de calibración.

3.2.3 Determinación de los niveles mínimos de detección (NMD) y cuantificación (NMC). Los resultados obtenidos en la determinación del NMD y NMC del DAD se observan en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Niveles mínimos de detección y de cuantificación de los pesticidas estudiados.

Pesticidas	Nmd, µg/L	Nmc, µg/L
Dimetoato	0,15	0,40
Clorotalonil	0,13	0,32
Clorpirifos	0,03	0,08
Tebuconazol	0,01	0,19

3.2.4 Exactitud del método. Se estableció como exactitud del método el porcentaje de recuperación que es particular para cada pesticida. Para esto se simuló en el laboratorio la aspersion de sobre la mora, enriqueciéndola con una mezcla de pesticidas a una concentración de 1 ppm (adicionando 10 µL de una solución stock de 100 ppm); a la mora libre de pesticidas se le realizó un lavado previo con diclorometano, la homogeneización se realizó en un mortero lo que asegura que los pesticidas se hallen en el mismo entorno microscópico que en muestras contaminadas.

Posterior al enriquecimiento de la mora se le realizó el proceso de extracción (sección 2.8) y finalmente se determinaron los porcentajes de recuperación.

Los resultados obtenidos se reportan en la **Tabla 11**, los cuales muestran que los porcentajes de recuperación son buenos, ya que están dentro del rango aceptado por la AOAC [91] que es entre 70-130%.

Tabla 11. Porcentaje de recuperación de la mezcla de pesticidas adicionada a dos muestras de moras sin pesticidas.

Pesticida	Porcentaje de recuperación, %		\bar{x}	S	CV %
Dimetoato	88	98	93	7,0	7,5
Clorotalonil	112	113	112,5	0,8	0,8
Clorpirifos	97	94	96	1,9	2,0
Tebuconazol	94	95	94,5	0,6	0,6

3.2.5 Determinación de la reproducibilidad de la extracción. En la **Tabla 11** se presentan los coeficientes de variación, que se encuentran en el rango de 0,6–7,5 %, y que cumplen con las GLP [84].

3.3 EXTRACCIÓN DE PESTICIDAS EN MUESTRAS DE MORA

Una vez implementada la metodología de extracción y análisis de los pesticidas: dimetoato, clorpirifos, clorotalonil y tebuconazol; se analizaron muestras de moras adquiridas de diferentes proveedores escogidos de manera aleatoria en distintos mercados locales.

En las **Figuras 10-12**, se observan perfiles cromatográficos de las tres diferentes muestras de mora *versus* la mezcla de pesticidas de interés, analizadas por GC-ECD utilizando la metodología previamente descrita. En general se observa que las muestras presentan compuestos que dan respuesta en este detector pero los tiempos de retención de estos no

coinciden con los pesticidas de interés, lo cual se confirmó haciendo el análisis por GC-MSD (ver sección 3.4).

En **Tablas 12–14** se reportan los resultados obtenidos en las muestras analizadas, teniendo en cuenta los porcentajes de recuperación y los niveles mínimos de detección del método.

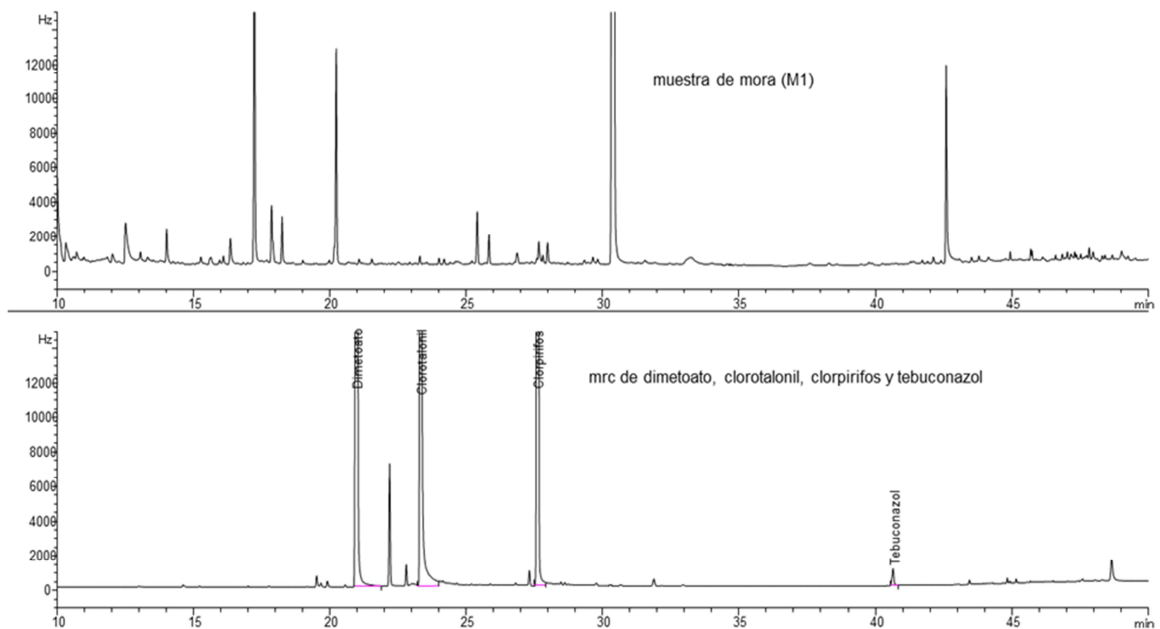


Figura 10. Perfil cromatográfico del extracto de mora M1 para la determinación de dimetoato, clorotalonil, clorpirifos y tebuconazol; analizados por GC-ECD. Columna DB-5 [5%fenil-poli(dimetilsiloxano), 30m x 0,25mm x 0,25µm].

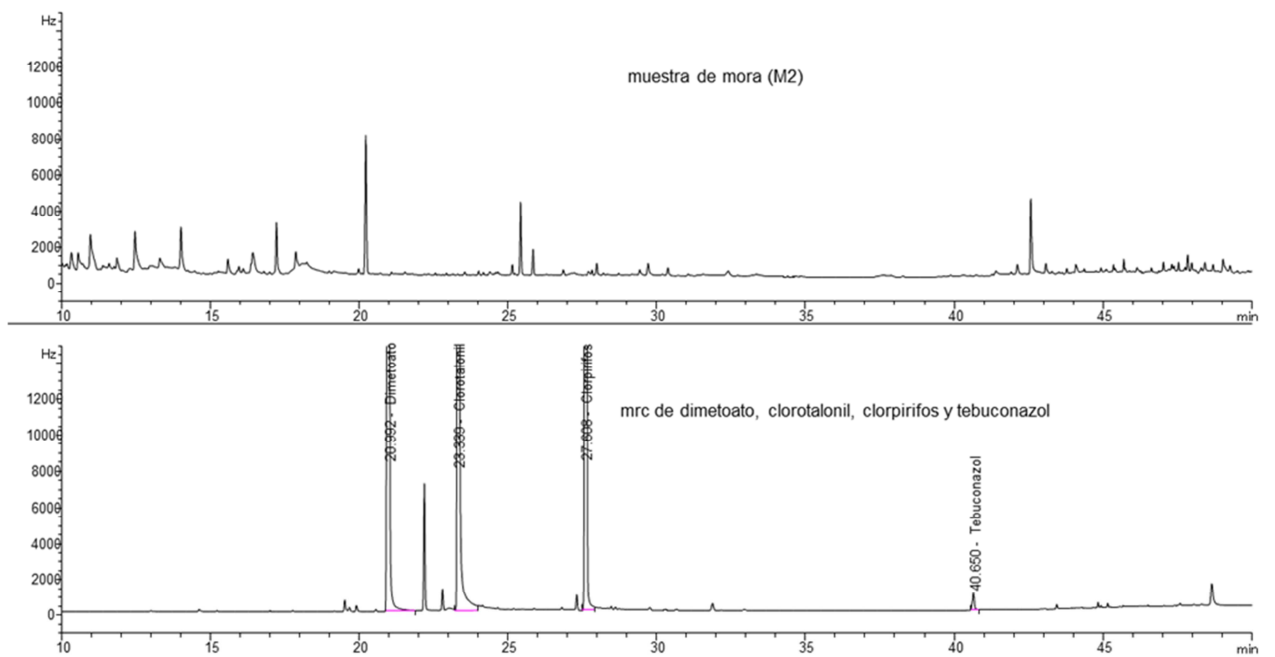


Figura 11. Perfil cromatográfico del extracto de mora M2 para la determinación de dimetoato, clorotalonil, clorpirifos y tebuconazol; analizados por GC-ECD. Columna DB-5 [5%fenil-poli(dimetilsiloxano), 30m x 0,25mm x 0,25 μ m].

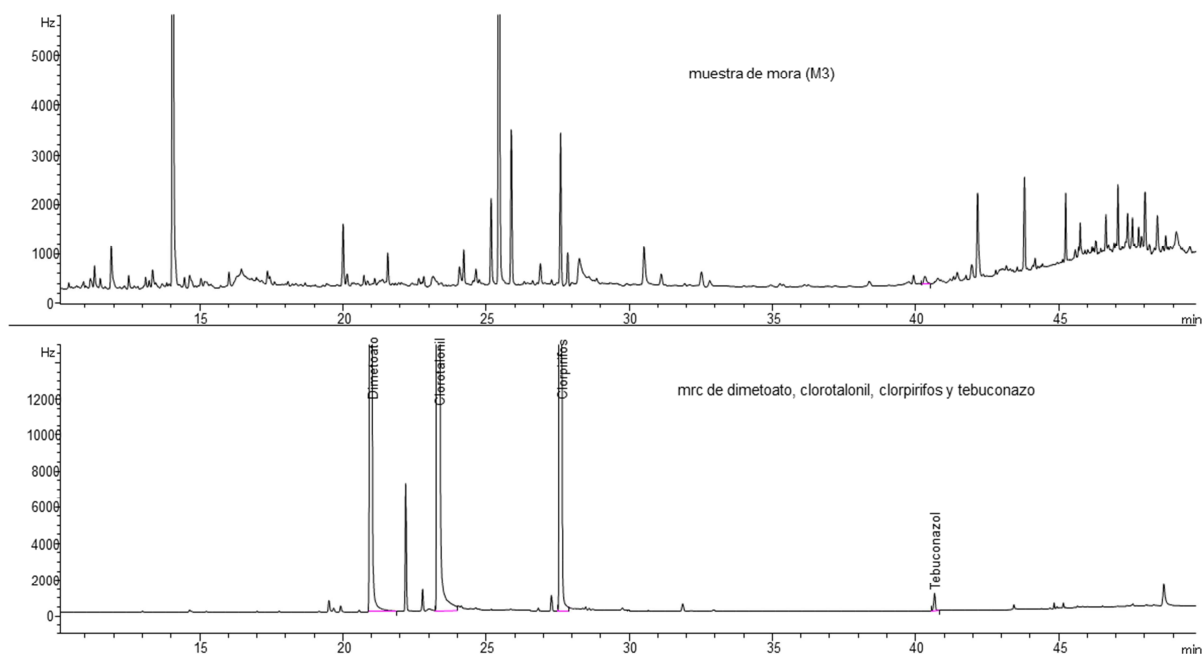


Figura 12. Perfil cromatográfico del extracto de mora M3 para la determinación de dimetoato, clorotalonil, clorpirifos y tebuconazol; analizados por GC-ECD. Columna DB-5 [5%fenil-poli(dimetilsiloxano), 30m x 0,25mm x 0,25 μ m].

3.4 ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas se usó como herramienta de confirmación bajo las condiciones previamente descritas; a continuación se presenta en la **Tabla 12** un resumen de los iones seleccionados luego de analizar los analitos en modo *sim*.

Tabla 12. Iones seleccionados de los pesticidas.

PESTICIDA*	Iones <i>m/z</i>		
Dimetoato	229	143	125
Clorotalonil	266	229	194
Clorpirifos	314	286	197
Tebuconazol	307	250	125

* ver espectros en **Anexo 2**.

En la **Tabla 13** se presenta un resumen de los resultados obtenidos en la aplicación de la metodología sobre muestras reales. En estos resultados se observa que solo el tebuconazol se encontraba en una muestra de mora y que éste estaba por encima de los NMR permitidos. También se observa que los niveles mínimos de cuantificación del método analítico están por debajo de los niveles residuales permitidos.

Tabla 13. Concentración de dimetoato clorotalonil, clorpirifos y tebuconazol ($\mu\text{g/g}$) obtenido en las muestras de mora analizadas Vs niveles mínimos residuales permitidos.

PESTICIDA	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		NMR*
	$\mu\text{g/g}$	($\pm\text{S}$)	$\mu\text{g/g}$	($\pm\text{S}$)	$\mu\text{g/g}$	($\pm\text{S}$)	$\mu\text{g/g}$
Dimetoato	<0,67	$\pm 0,02$	<0,67	$\pm 0,02$	<0,67	$\pm 0,02$	5
Clorotalonil	<0,53	$\pm 0,02$	<0,53	$\pm 0,02$	<0,53	$\pm 0,02$	5
Clorpirifos	<0,133	$\pm 0,002$	<0,133	$\pm 0,002$	<0,133	$\pm 0,002$	0,3
Tebuconazol	<0,317	$\pm 0,009$	<0,317	$\pm 0,009$	4,600	$\pm 0,009$	3

*NMR: Nivel mínimo residual, *Codex alimentarius* **FAO** y **OMS** 2010.

4. DETERMINACIÓN DE CARBENDAZIM, IMIDACLOPRID Y BENOMIL: DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 MÉTODO CROMATOGRÁFICO.

Para el análisis de imidacloprid y carbendazim, se evaluaron las condiciones cromatográficas: composición de la fase móvil (**Tabla 14**) y longitud de onda.

El benomil a pH básico reacciona convirtiéndose en carbendazim. Por este motivo no fue posible determinarlo de manera simultánea con el imidacloprid y el carbendazim. Fue necesario aplicar unas condiciones cromatográficas distintas para su determinación (ver **Tabla 15**).

4.1.1 Selección de la fase móvil. Se evaluaron las siguientes proporciones de solventes para la determinación del imidacloprid y carbendazim:

Tabla 14. Composiciones de la fase móvil examinadas para la determinación de imidacloprid y carbendazim.

Ensayo	Fase móvil
a.	Análisis en régimen isocrático, con 100% metanol.
b.	90:10, metanol:agua.
c.	20:80, metanol: H ₂ O (0,006% amoniaco).
d.	50:50, metanol: H ₂ O (0,006% amoniaco).

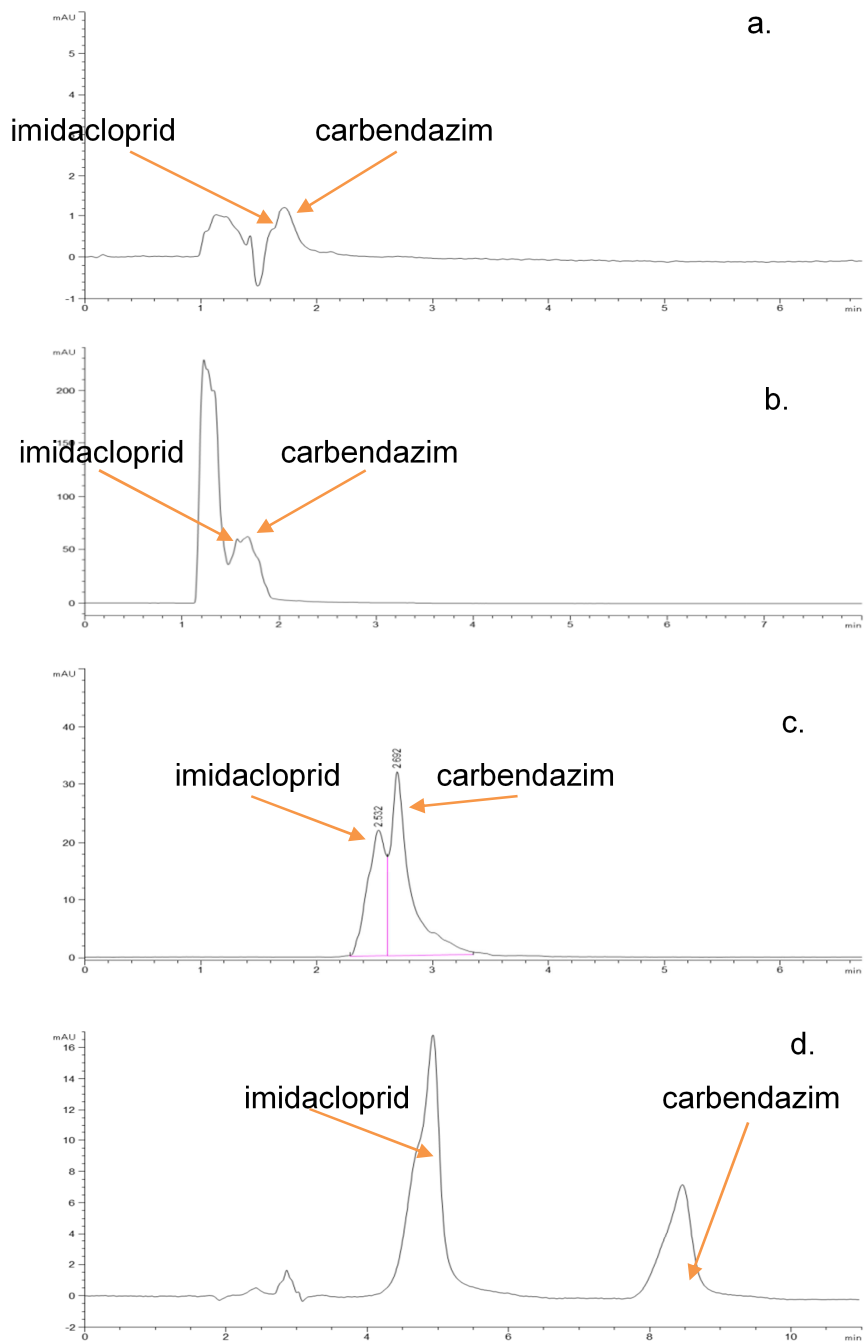


Figura 13. Cromatogramas obtenidos de los ensayos realizados utilizando las fases móviles de la **Tabla 14**, columna Zorbax C18 RP, solución stock de imidacloprid y carbendazim de 1 ppm.

En la **figura 13** se observan los cromatogramas obtenidos en cada uno de los ensayos realizados; también se observa que en el cromatograma **d** la separación del imidacloprid y el carbendazim es aceptable.

En la **figura 14** ensayo **a** se observa que el benomil se degrada por efecto del solvente y el pH, si se analiza bajo las condiciones cromatográficas establecidas para la determinación del carbendazim.

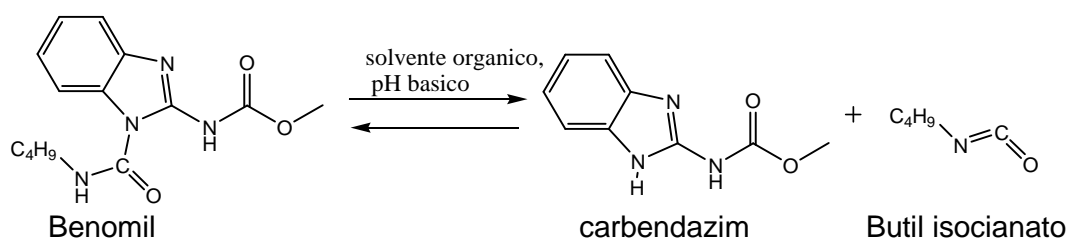


Figura 14. Degradación del benomil en solventes orgánicos a temperatura ambiente [33].

Por tal razón se realizaron análisis cromatográficos a pH ácido para la determinación de este compuesto, evaluando las siguientes proporciones de solventes: que aparecen en la **Tabla 15**. Flujo de 1 mL/min para todas las corridas y volumen de inyección, $V_{iny}= 20 \mu\text{L}$.

Tabla 15. Composiciones de la fase móvil examinadas para la determinación del benomil

Ensayo	Fase móvil
a	50:50, metanol: H ₂ O (0.006% amoniaco).
b	30:70, Acetonitrilo:H ₂ O (0.1% ácido acético).
c	30:70, Acetonitrilo:H ₂ O (0.1% ácido orto-fosfórico).

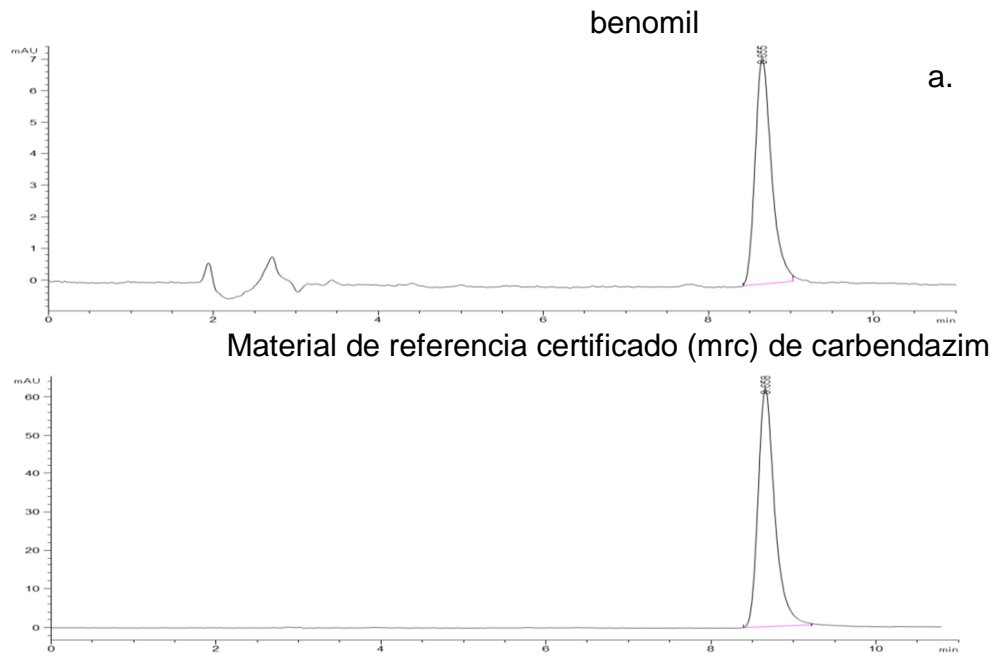


Figura 15. Cromatograma obtenido del ensayo a (Tabla 18), mrc de benomil de 1 ppm, columna Zorbax C18 RP. Comparado con el mrc de carbendazim.

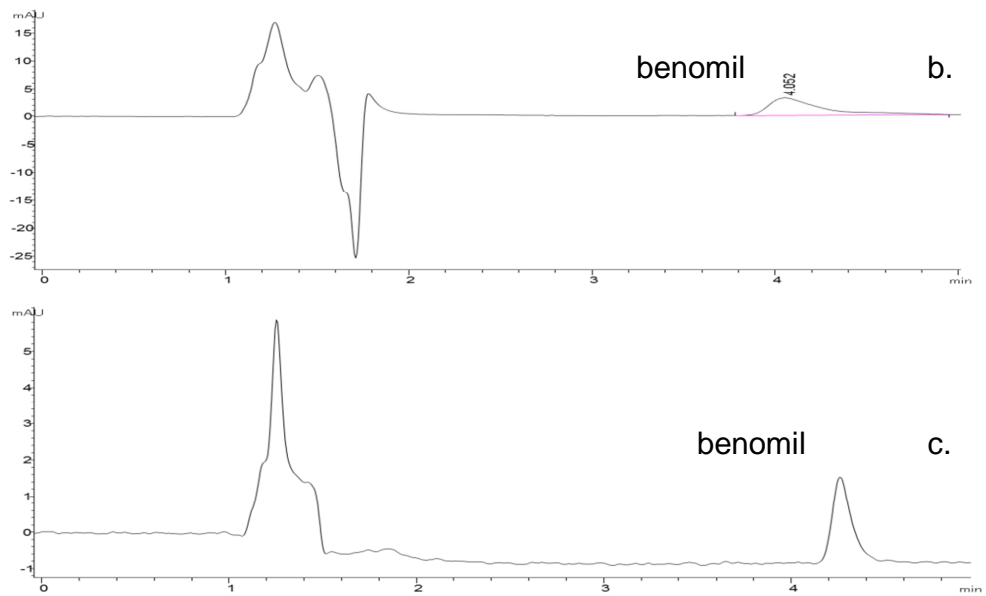


Figura 16. Cromatogramas obtenidos de los ensayos realizados de la Tabla 15, mrc de benomil de 1 ppm, columna Zorbax C18 RP.

En la **figura 16 c** se observa que la forma del pico es más simétrica que en el cromatograma b. por tal razón se escogió como fase móvil el ensayo c (**Tabla 15**).

4.1.2 Selección de la longitud de onda La longitud de onda de trabajo se seleccionó teniendo en cuenta la máxima absorbancia de los pesticidas: imidacloprid, carbendazim y benomil. Para ello, se tomó el espectro ultravioleta visible de cada pesticida, realizando un barrido en la región de 190 a 900 nm.

Las longitudes de máxima absorción se presentan en las **Figuras 17 y 18**. Las longitudes de onda de trabajo están en la **Tabla 19**.

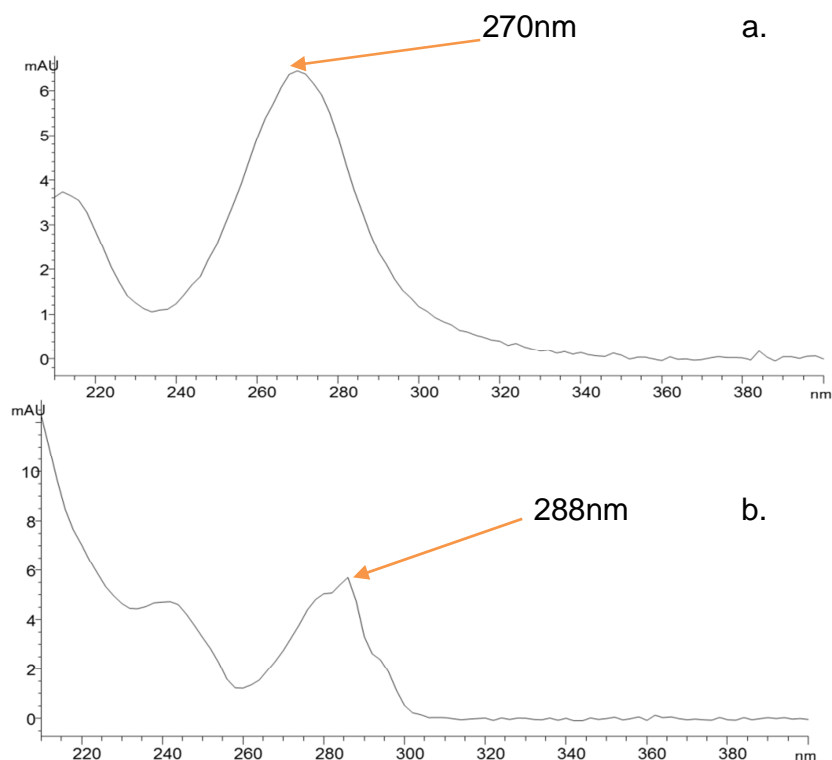


Figura 17. Espectros ultravioleta-visible de: a. imidacloprid, b. carbendazim.

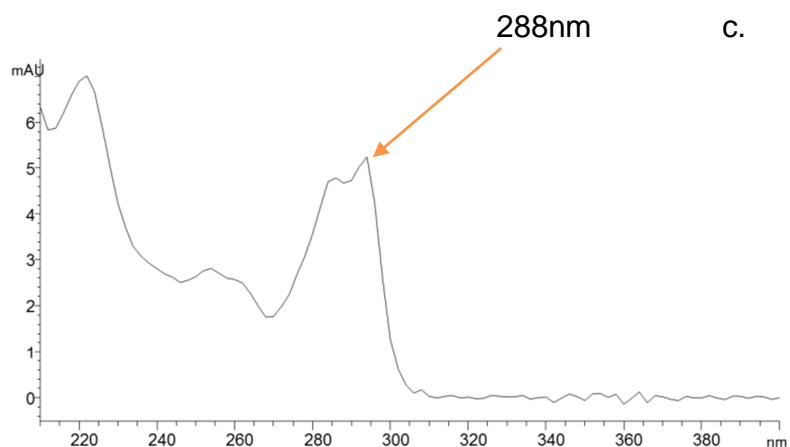


Figura 18. Espectro ultravioleta-visible del benomil.

Tabla 16. Longitud de onda seleccionada para los pesticidas analizados.

Pesticida	Longitud de onda de máxima absorción, nm
Imidacloprid	270
Carbendazim	288
Benomil	288

En la **Tabla 17** se presentan los parámetros cromatográficos empleados en el presente trabajo para el análisis de imidacloprid, carbendazim y benomil; como se observa, el único parámetro que cambia es la fase móvil en la determinación del benomil. Los demás parámetros son los mismos para los tres pesticidas.

Tabla 17. Parámetros cromatográficos empleados en el presente trabajo para el análisis de imidacloprid, carbendazim y benomil por HPLC/DAD.

Parámetros	Especificaciones
Flujo	1 mL/min
Fase móvil para imidacloprid y carbendazim	metanol: H ₂ O (0,006% amoniaco),50:50
Fase móvil para benomil	Acetonitrilo : H ₂ O (0.1% ácido orto-fosfórico) ,30:70
Temperatura	35 °C
Volumen de inyección	20 µL
Columna	ZORBAX Eclipse XDB-C18(4,6 mm x 150 mm x 5 µm)

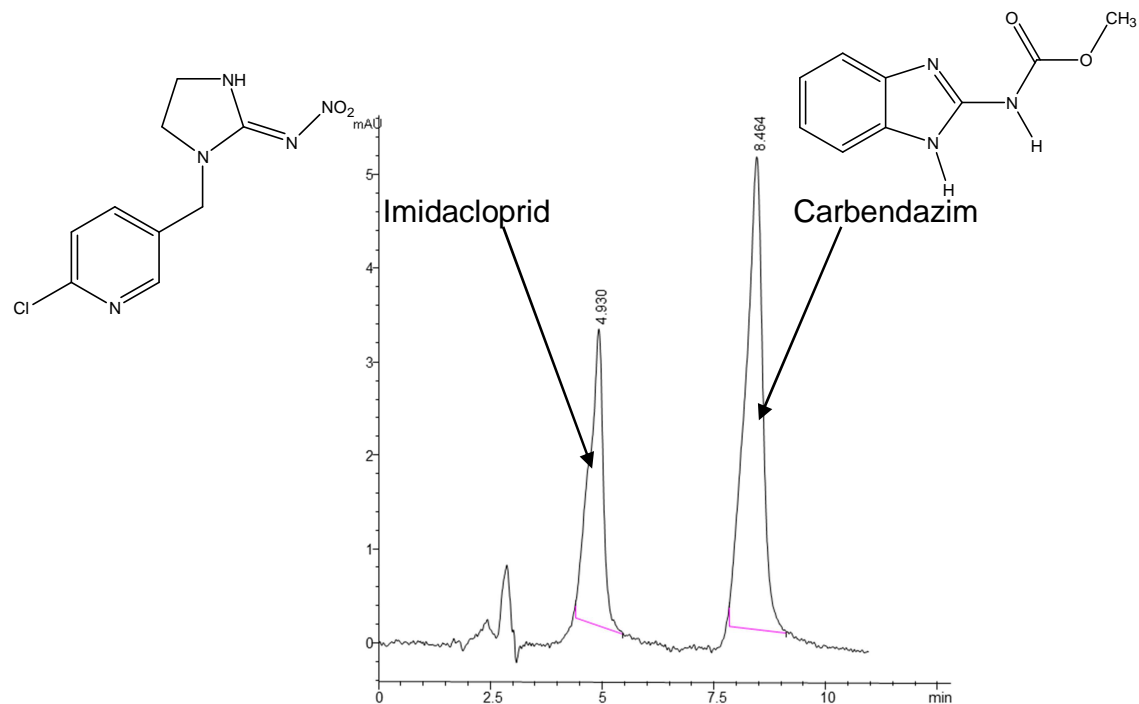


Figura 19. Perfil cromatográfico del imidacloprid y carbendazim obtenido por HPLC – DAD. Columna Zorbax C₁₈ RP. Mezcla de pesticidas de 1 µg/mL.

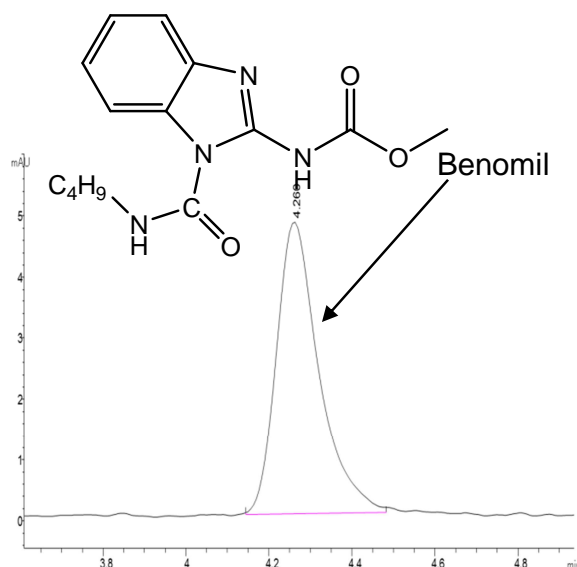


Figura 20. Perfil cromatográfico del benomil obtenido por HPLC – DAD. Columna Zorbax C₁₈ RP. Concentración, 1 µg/mL.

4.2 PARÁMETROS DE EFICIENCIA DE LA SEPARACIÓN.

En la **Tabla 18** se reportan los parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica determinados bajo las condiciones de operación establecidas y calculados a diferentes longitudes de onda. Se observa que los parámetros de eficiencia están acorde con lo reportado en la literatura con una resolución mayor de 1,5 [75-77].

Tabla 18. Parámetros de eficiencia de la separación de los pesticidas analizados, utilizando parámetros operacionales reportados en la **Tabla 17**.

Longitud de onda, nm	Pesticida	t_R , min	W_b , min	N^*	σ^*	k'^*	R_s^*
270	Imidacloprid	4,924	0,376	947	-	2,9	-
288	Carbendazim	7,064	0,417	2321	1,92	5,7	5,26
288	Benomil	4,264	0,108	8219	-	2,38	-

* N : Número de platos teóricos; σ : Factor de selectividad; k' : Factor de retención; R_s : Resolución

4.3 FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO PARA HPLC/DAD.

4.3.1 Evaluación de la repetibilidad del método cromatográfico para tiempos de retención (t_R) y áreas. Al inyectar tres veces una mezcla de pesticidas (20 μ L, 1 ppm), se determinó la repetibilidad del método. Los resultados de la evaluación de la repetibilidad de t_R y áreas de los picos cromatográficos, se observan en las **Tablas 22** y **23**, respectivamente.

Tabla 19. Repetibilidad de los t_R de los pesticidas analizados por HPLC/DAD.

Pesticida	t_R , min					\bar{X}	S	CV, %
	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Medida 4	Medida 5			
Imidacloprid	4,929	4,93	4,928	4,923	4,926	4,927	0,003	0,06
Carbendazim	7,064	7,064	7,059	7,059	7,060	7,061	0,003	0,03
Benomil	4,268	4,278	4,264	4,261	4,262	4,267	0,007	0,16

n =5 réplicas.

Tabla 20. Repetibilidad de áreas cromatográficas de los pesticidas analizados por HPLC/DAD.

Pesticida	Área, mAU*s					— X	S	CV, %
	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Medida 4	Medida 5			
Imidacloprid	166,278	166,104	162,917	157,873	165,705	164	3,0	2,2
Carbendazim	155,260	151,464	150,739	147,360	152,333	152	2,0	1,9
Benomil	18,637	17,321	17,641	17,396	17,951	18,0	0,5	3,0

n =5 réplica

En las **Tablas 19** y **20** se observa que los coeficientes de variación, CV, no superaron el 5% para la medición de áreas y t_R , y figuran dentro de lo recomendado por las GLP [84].

4.3.2 Evaluación del RDL y de la sensibilidad del método. El RDL y la sensibilidad se determinaron con base en los datos obtenidos de la curva de calibración, para cada uno de los pesticidas analizados (ver **Anexo 1**). En la **Tabla 21**, se muestra, para cada pesticida, la ecuación de la curva de calibración, el coeficiente de determinación, R^2 , que mide el ajuste de la curva para el rango de concentraciones evaluado para el imidacloprid y el carbendazim (200 – 2000 ppb) y para el benomil (400 – 5000 ppb); la pendiente de la curva (factor de respuesta, R_f) y la desviación estándar de la pendiente (evaluando, el área de respuesta), miden la sensibilidad del método.

Tabla 21. Ecuación de la curva de calibración; Coeficiente de determinación, R^2 , pendiente y desviación estándar de la pendiente, obtenidos en la determinación de los pesticidas a partir de la curva de calibración (200 – 2000 ppb) para el imidacloprid y el carbendazim y (400– 5000 ppb) para el benomil, por HPLC/DAD.

Pesticida	Ecuación	R	R_f	S_{Rf}	$R_f \pm tS_{Rf}$
Imidacloprid	$y = 224,6x - 16,6$	0,999	224,6	1,5	$225 \pm 3,0$
Carbendazim	$y = 194,3x - 1,336$	0,998	194,3	1,4	$194 \pm 3,0$
Benomil	$y = 12,18x - 2,445$	0,999	12,18	0,2	$12,2 \pm 0,3$

R_f : Pendiente S_{Rf} : Desviación estándar de la pendiente t: 2,57 para un 95% de confianza.

En la **Tabla 21**, se observa que el R^2 se encuentra en el rango de 0.998-0.999, para las curvas de calibración obtenidas en el rango evaluado, lo que indica un buen ajuste de los parámetros. Por tanto, el RDL del método implementado para el imidacloprid y el carbendazim fue de (200 – 2000 ppb) y para el benomil de (400 – 5000 ppb). La sensibilidad del método se determinó como la pendiente de la curva de calibración.

4.3.3 Determinación de los niveles mínimos de detección (NMD) y cuantificación (NMC). Para la determinación del NMD y NMC del DAD se siguieron los criterios descritos en las **Secciones 6.7.5** y **6.7.6**; a continuación se presentan en la **Tabla 22** los NMD y NMC para cada uno de los pesticidas estudiados.

Tabla 22. Niveles mínimos de detección y de cuantificación del DAD de los pesticidas imidacloprid, carbendazim y benomil.

Pesticida	NMD, µg/L	NMC, µg/L
Imidacloprid	0,11	0,20
Carbendazim	0,07	0,20
Benomil	0,09	0,11

4.3.4 Exactitud del método. Teniendo las condiciones del método de extracción, se realizó la evaluación del porcentaje de recuperación. Se utilizó el procedimiento de extracción de pesticidas en dos muestras de mora libres de pesticidas y enriquecidas con pesticidas en una concentración determinada (ver sección 3.2.4); los resultados obtenidos se reportan en la **Tabla 23**.

Tabla 23. Porcentaje de recuperación de la mezcla de pesticidas adicionada a dos muestras de moras sin pesticidas.

Pesticida	Mora libre de pesticidas	Áreas (mAU*s)				Porcentaje de recuperación	
		inicial	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio	Promedio, %	
Imidacloprid	0	1569,8599	1355,03564	1268,00183	1311,5	84	±4,0
Carbendazim	0	585,87300	432,34595	455,03021	443,7	76	±3,0
Benomil	0	646,80786	415,4028	434,42422	424,9	66	±2,0

Como se observa en la **Tabla 23**, los porcentajes de recuperación de los pesticidas fueron aceptables (76- 84%), excepto para el benomil (66%).

4.3.5 Determinación de la reproducibilidad de la extracción. Para calcular la reproducibilidad de la extracción, se realizó un duplicado de una muestra de mora enriquecida con los pesticidas bajo estudio. La reproducibilidad fue evaluada como el coeficiente de variación (**Tabla 24**).

Tabla 24. Reproducibilidad de la extracción para el análisis de una muestra de mora enriquecida.

Pesticida	Porcentaje de recuperación, %		\bar{X}	S	CV, %
	Medida 1	Medida 2			
Imidacloprid	86	81	84	4,0	4,7
Carbendazim	74	78	76	3,0	3,6
Benomil	64	67	66	2,0	3,2

En la **Tabla 24** se observan los coeficientes de variación, que se encuentran en el rango de 3 -5 %, y cumplen con las GLP [85].

4.4 EXTRACCIÓN DE PESTICIDAS EN MUESTRAS COMERCIALES

Una vez implementada la metodología de extracción y análisis de los pesticidas, se analizaron muestras de mora adquiridas en el mercado local. En las **Figuras 21-23**, se observan perfiles cromatográficos típicos de los pesticidas imidacloprid y carbendazim. En las **Figuras 24-26** se observan perfiles cromatográficos típicos del benomil. Estos pesticidas fueron aislados de diferentes muestras de mora, analizadas por HPLC-DAD en columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 RP. Las condiciones cromatográficas están descritas en la **Tabla 17** y el procedimiento de preparación de la muestra en la **sección 2.8**.

En la **Tabla 25** se reportan las concentraciones de imidacloprid, carbendazim y benomil en las muestras analizadas, teniendo en cuenta los porcentajes de recuperación y los niveles mínimos de detección del método.

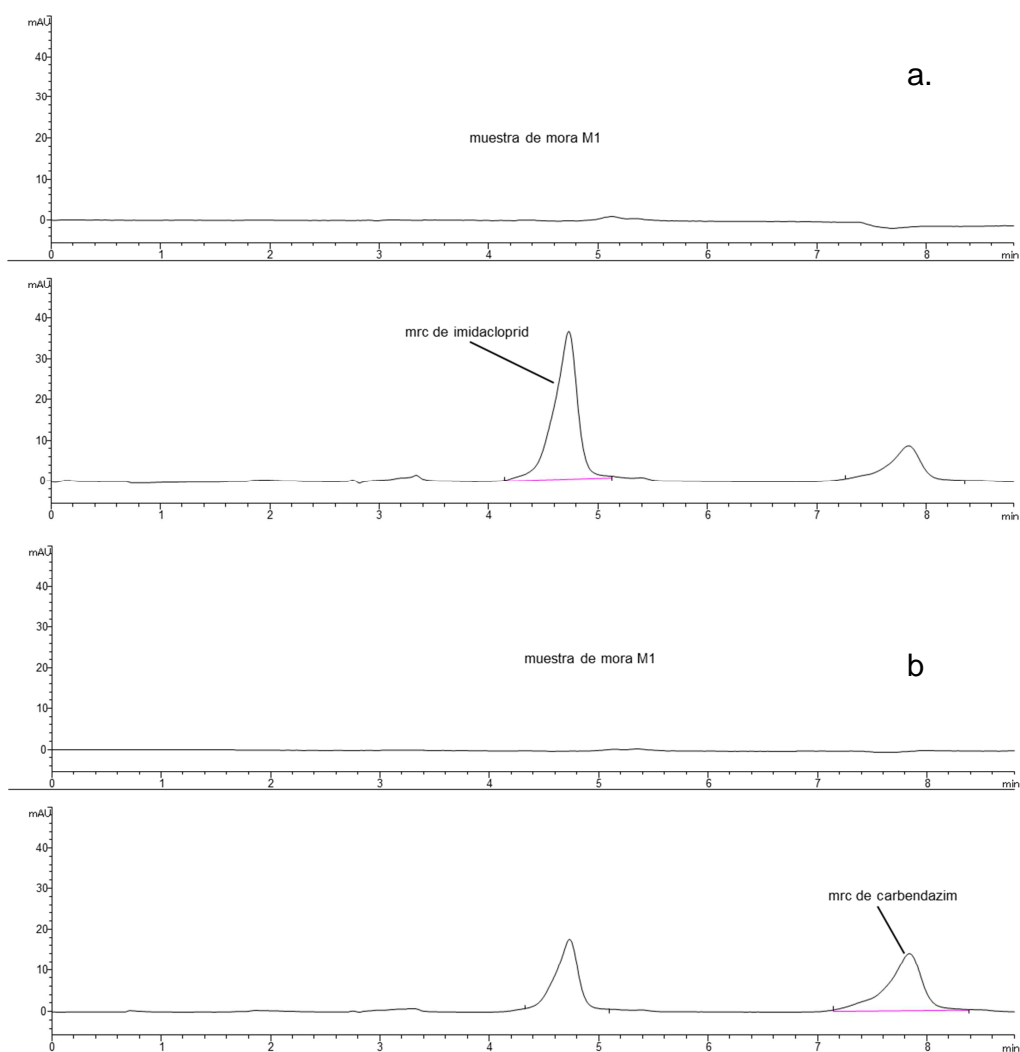


Figura 21. Perfiles cromatográficos del extracto de mora M1 para la determinación de **a.** imidacloprid (270nm) y **b.** carbendazim (288 nm); analizados por HPLC-DAD. Columna Zorbax Eclipse XDB-C18.

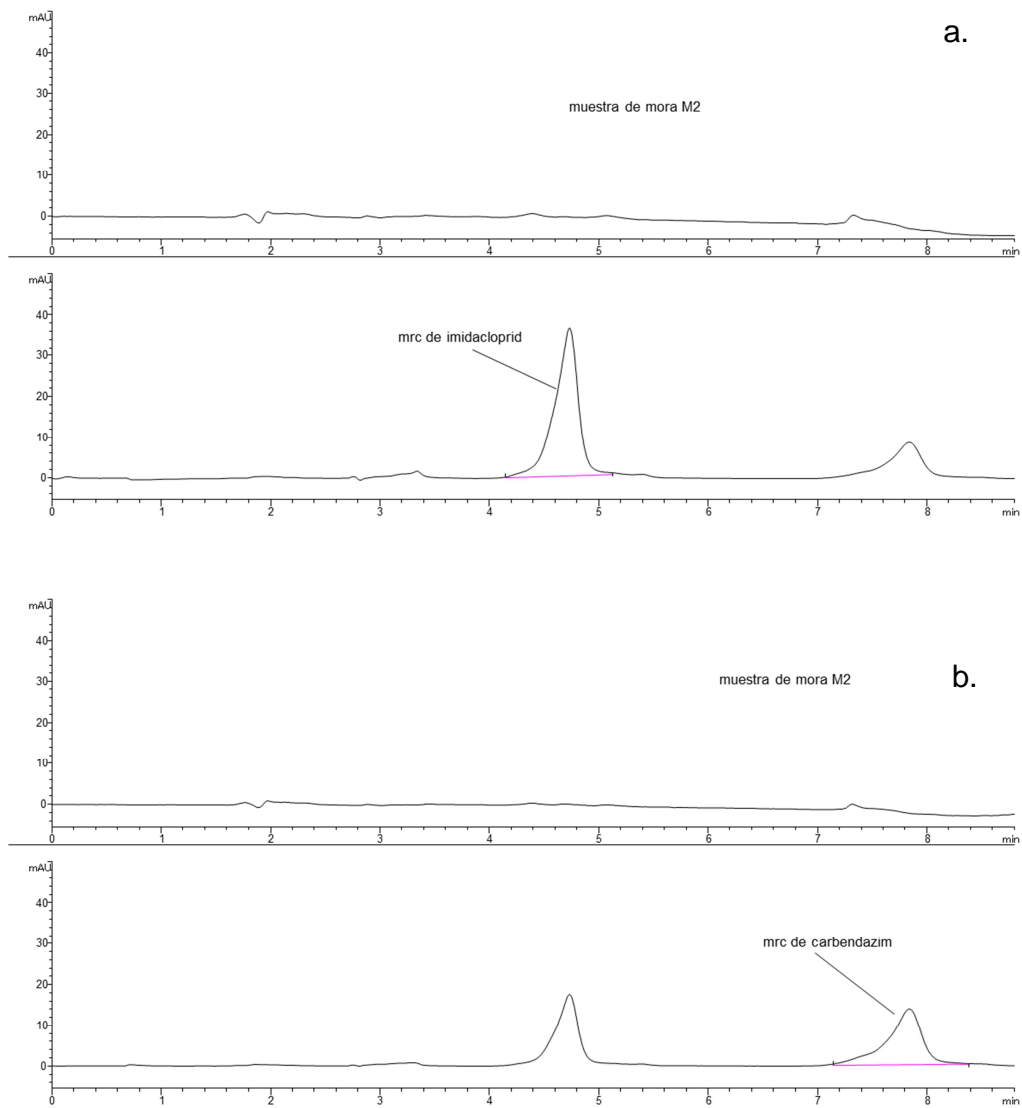


Figura 22 Perfiles cromatográficos del extracto de mora M2 para la determinación de **a.** imidacloprid (270nm) y **b.** carbendazim (288 nm); analizados por HPLC-DAD. Columna Zorbax Eclipse XDB-C18.

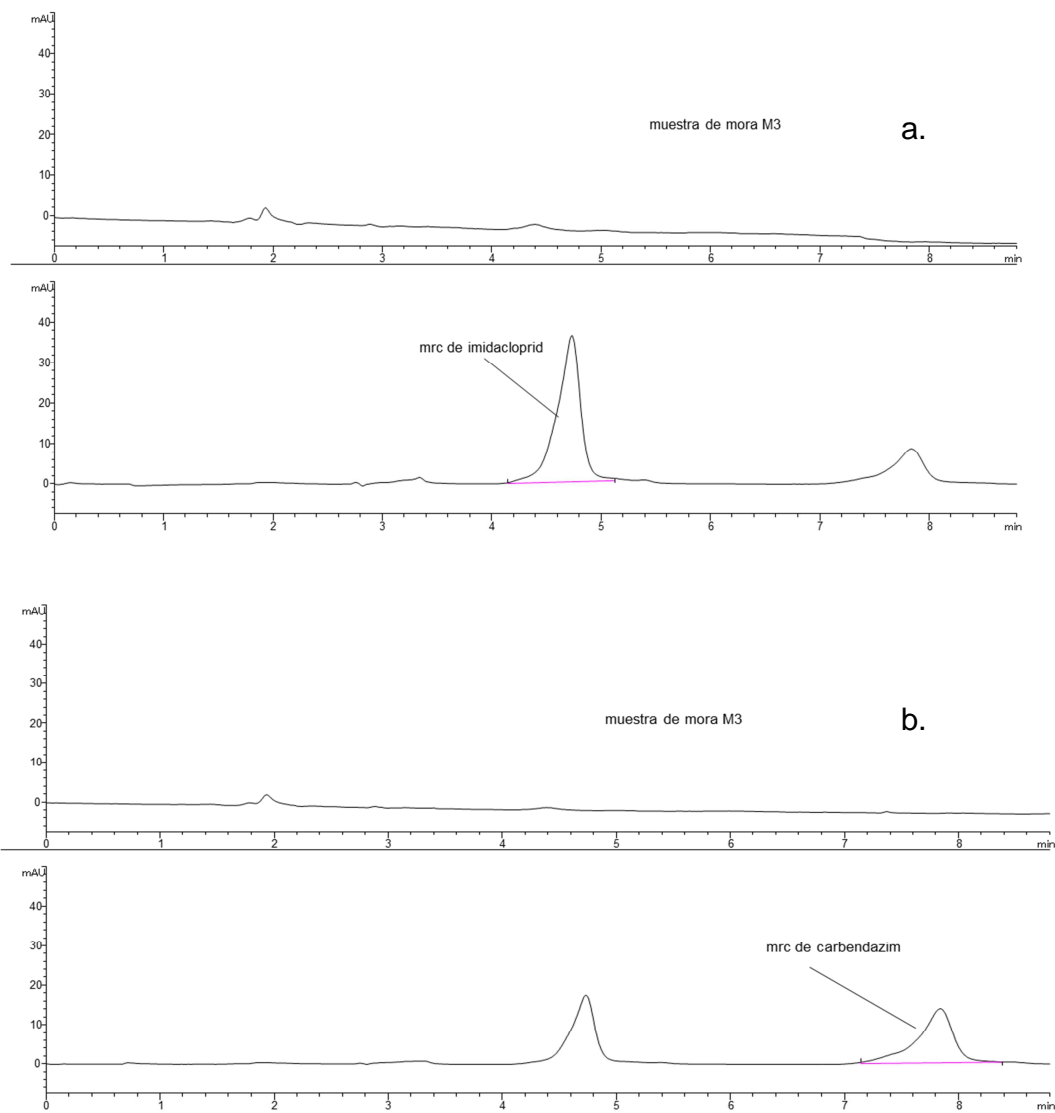


Figura 23. Perfiles cromatográficos del extracto de mora M3 para la determinación de **a.** imidacloprid (270nm) y **b.** carbendazim (288 nm); analizados por HPLC-DAD. Columna Zorbax Eclipse XDB-C18.

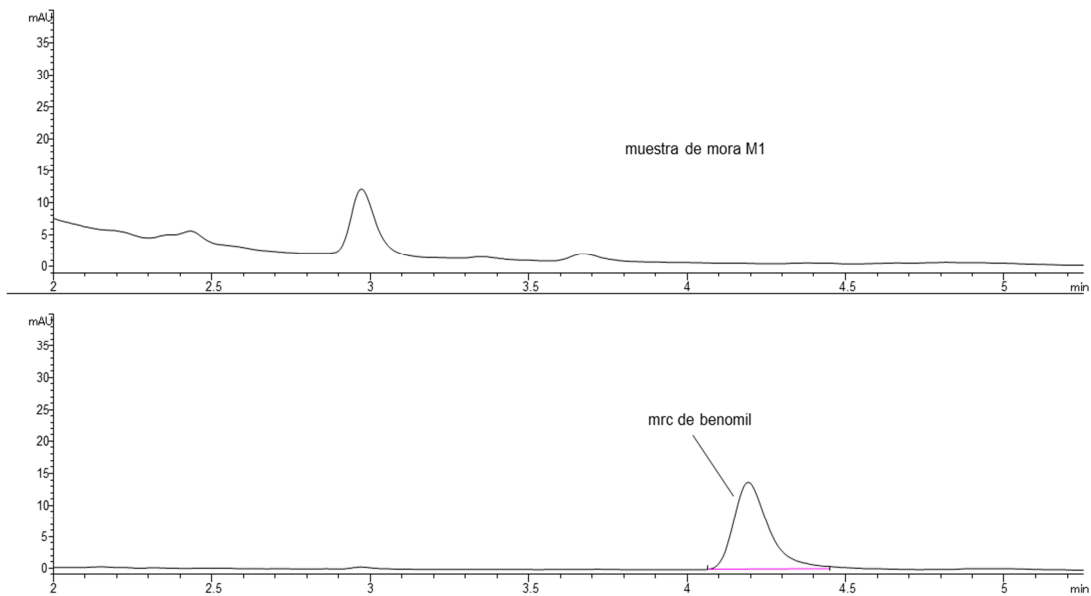


Figura 24. Perfil cromatográfico del benomil (288nm) en la muestra de mora M1, analizada por HPLC-DAD. Columna Zorbax Eclipse XDB-C18.

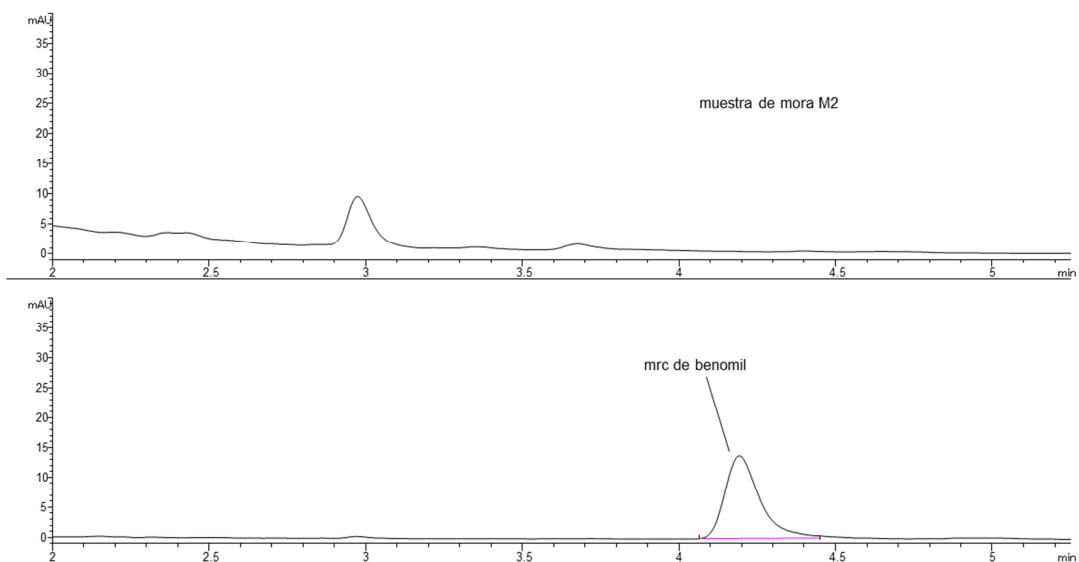


Figura 25. Perfil cromatográfico de benomil (288nm) en la muestra de mora M2, analizada por HPLC-DAD. Columna Zorbax Eclipse XDB-C18.

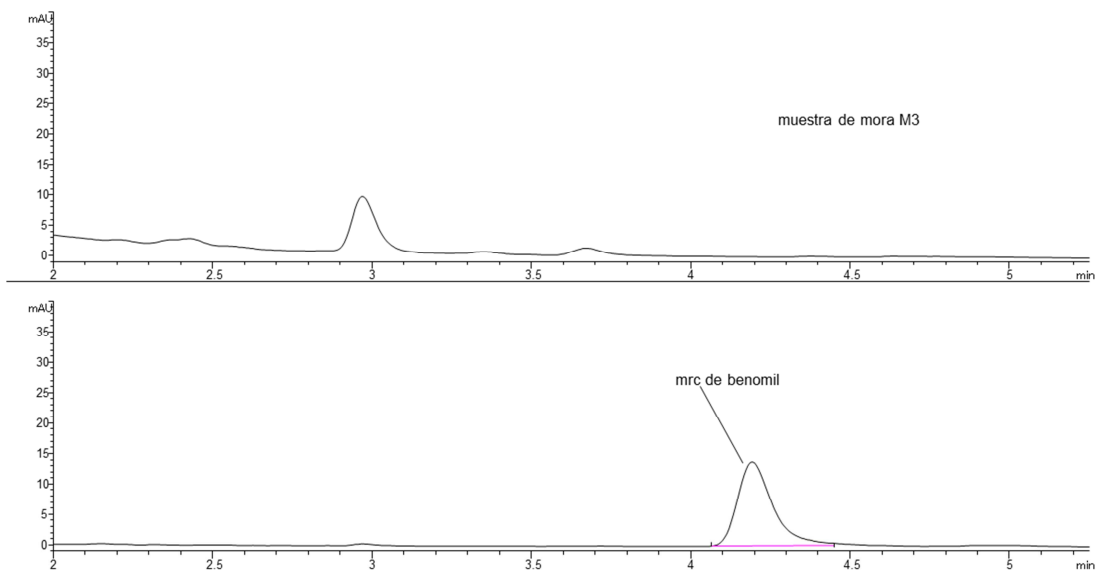


Figura 26. Perfil cromatográfico del benomil (288nm) en la muestra de mora M3, analizada por HPLC-DAD. Columna Zorbax Eclipse XDB-C18.

Tabla 25. Concentración de imidacloprid, carbendazim y benomil ($\mu\text{g/g}$) en las muestras de mora analizadas y niveles mínimos residuales permitidos (NMR).

Pesticida	MUESTRA 1		MUESTRA 2		MUESTRA 3		NMR*
	$\mu\text{g}/10\text{g}$	($\pm\text{S}$)	$\mu\text{g}/10\text{g}$	($\pm\text{S}$)	$\mu\text{g}/10\text{g}$	($\pm\text{S}$)	$\mu\text{g}/10\text{g}$
Imidacloprid	<0,33	$\pm 0,02$	<0,33	$\pm 0,02$	<0,33	$\pm 0,02$	0,5
Carbendazim	<0,33	$\pm 0,04$	0,70	$\pm 0,04$	<0,33	$\pm 0,04$	0,5
Benomil	<0,18	$\pm 0,02$	<0,18	$\pm 0,02$	<0,18	$\pm 0,02$	0,5

*NMR: Nivel mínimo residual, Codex alimentarius FAO y OMS 2010.

En la **Tabla 25** se presenta un resumen de los resultados obtenidos en la aplicación de la metodología sobre muestras reales. En estos resultados se observa que solo el carbendazim se encontraba en una muestra de mora y que éste estaba por encima de los NMR permitidos.

Se observa también que los niveles residuales permitidos están por encima de los niveles mínimos de detección y de cuantificación del método analítico.

5. DETERMINACIÓN DE MANCOZEB Y PROPINEB: DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 DERIVATIZACIÓN DEL MANCOZEB Y EL PROPINEB

El derivado se preparó siguiendo la metodología presentada en la **sección 2.8**.

5.1.1 Análisis del derivado. El extracto final obtenido, siguiendo la metodología de la **sección 2.8** se inyectó en un cromatógrafo de gases 6890N acoplado a un detector selectivo de masas. En las **Figuras 27 y 28** se presentan los espectros de masas de los derivados obtenidos del mancozeb y el propineb.

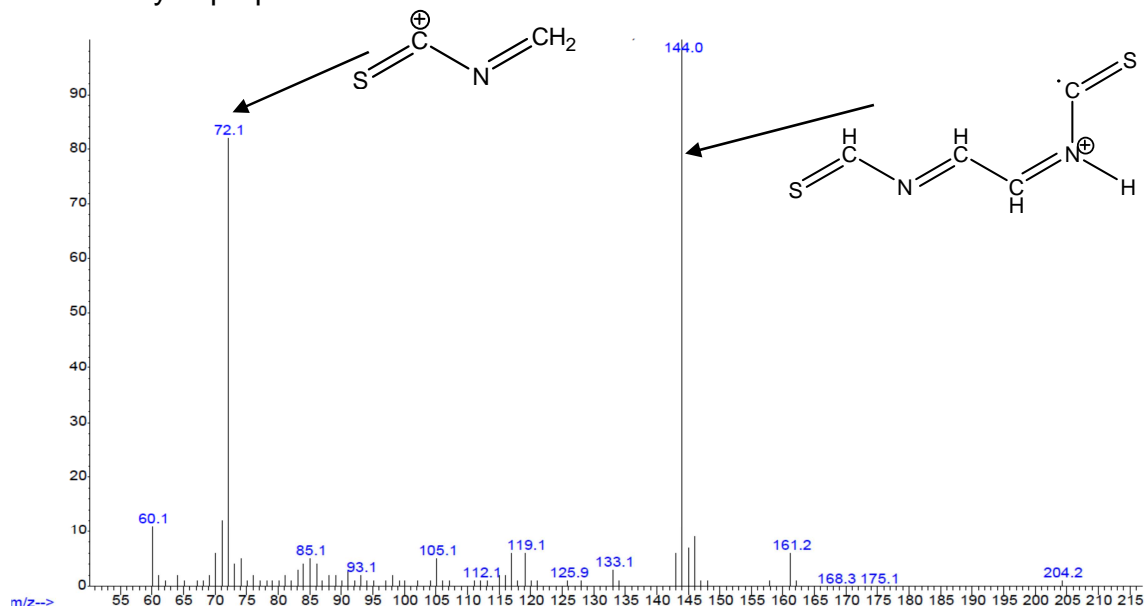


Figura 27. Espectro de masas del derivado del mancozeb. Columna DB-5 de 30m x 0,25mm x 0,25µm, *splitless* pulsado, modo *full scan* (40 - 300 *m/z*)



Figura 28. Espectro de masas del derivado del propineb. Columna DB-5 de 30m x 0,25mm x 0,25 μ m, *splitless* pulsado, modo *full scan* (40 - 300 *m/z*)

El espectro de masas del mancozeb **Figura 27**, coincide con el reportado por Tatsuhiko Kawamoto *et. al.* [92], en el cual se observan los iones *m/z* 144 y 72. De igual forma, en la **Figura 28**, se identificaron los iones en *m/z* 158 y 86, los cuales corresponden al derivado del propineb.

5.2 MÉTODO CROMATOGRÁFICO.

Para el análisis de mancozeb y propineb, utilizando HPLC-DAD, se evaluaron las condiciones cromatográficas, a saber: composición de la fase móvil y longitud de onda.

5.2.1 Selección de la fase móvil. Se evaluaron proporciones de los solventes, para la determinación del mancozeb y propineb en régimen isocrático **Tabla 26**.

Tabla 26. Evaluación de la fase móvil para la determinación mancozeb y propineb.

Ensayo	Fase móvil
a.	100% metanol.
b.	5:95, acetonitrilo: H ₂ O.
c.	20:80, acetonitrilo: H ₂ O.

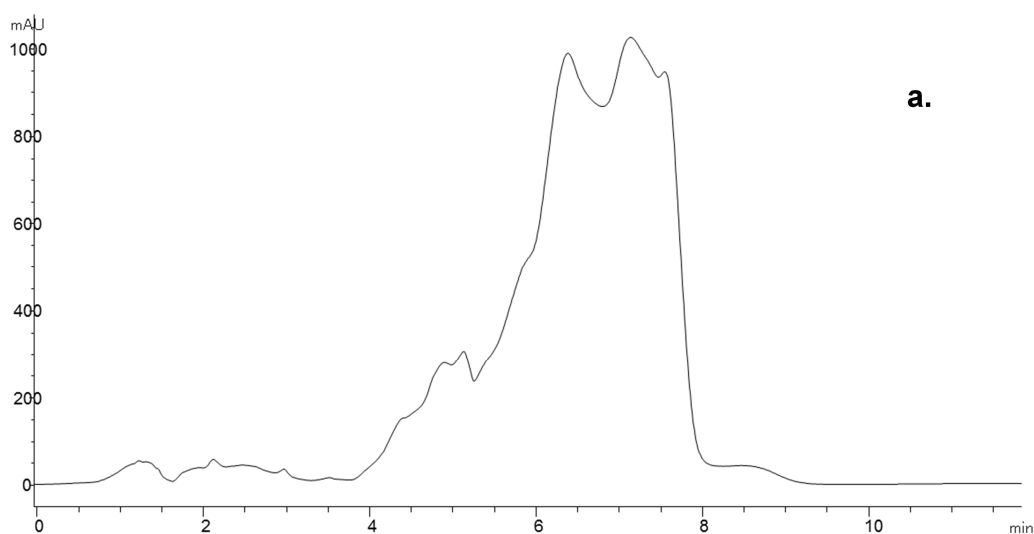


Figura 29. Cromatogramas obtenidos de los ensayos realizados, utilizando las fases móviles de la **Tabla 26**, columna Zorbax C18 RP; solución stock de mancozeb y propineb de 1 ppm.

(Continuación)

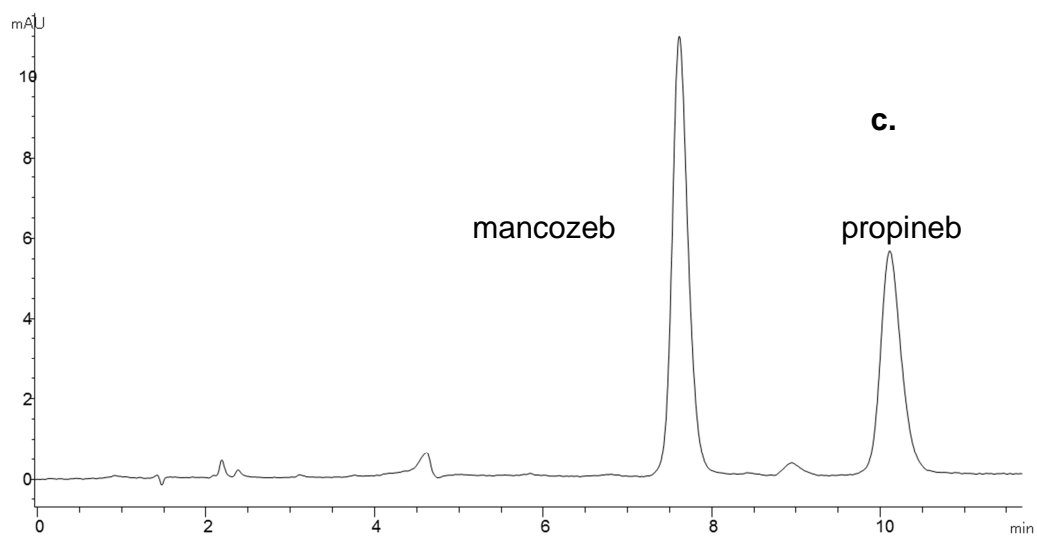
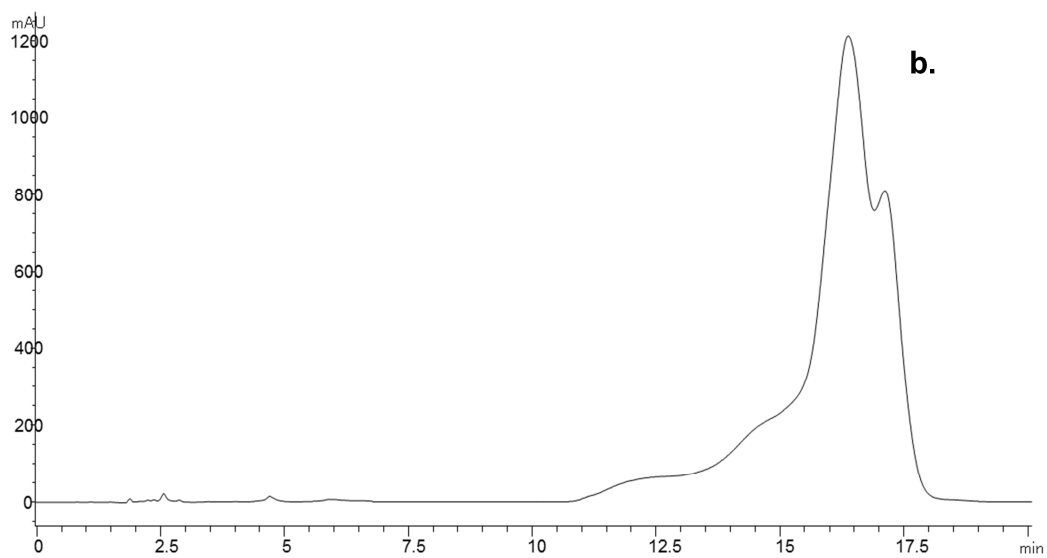


Figura 29. Cromatogramas obtenidos de los ensayos realizados, utilizando las fases móviles de la **Tabla 26**, columna Zorbax C18 RP; solución stock de mancozeb y propineb de 1 ppm.

El flujo de la fase móvil fue de 1 mL/min para todas las corridas y el volumen de inyección, $V_{iny}= 20 \mu\text{L}$.

Al analizar los cromatogramas obtenidos (**Figura 29**) se observa que en el ensayo **c**. se obtuvo una buena resolución de los picos cromatográficos y los tiempos de retención fueron superiores a 2 min siendo esto favorable en la separación cromatográfica. Así, se evita el solapamiento de los picos de interés con los picos cromatográficos de la matriz ya que estos últimos se observan entre los 0 y 2 min.

5.2.2 Selección de la longitud de onda La longitud de onda de trabajo se seleccionó teniendo en cuenta la máxima absorbancia de los pesticidas: mancozeb y propineb. Para ello, se tomó el espectro ultravioleta - visible de cada pesticida, realizando un barrido en la región de 190 a 900 nm.

Las longitudes de máxima absorción se presentan **Figura 30**. La longitud de onda de trabajo está en la **Tabla 27**.

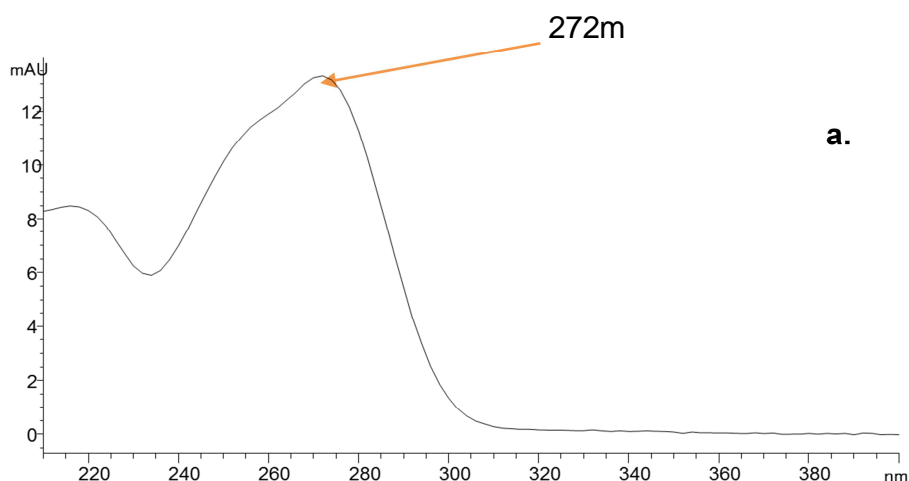


Figura 30. Espectro ultravioleta-visible obtenido en un cromatógrafo líquido AT 1200 con detector de arreglo de diodos, columna zorbax C18 RP. **a.** mancozeb **b.** propineb.

(Continuación)

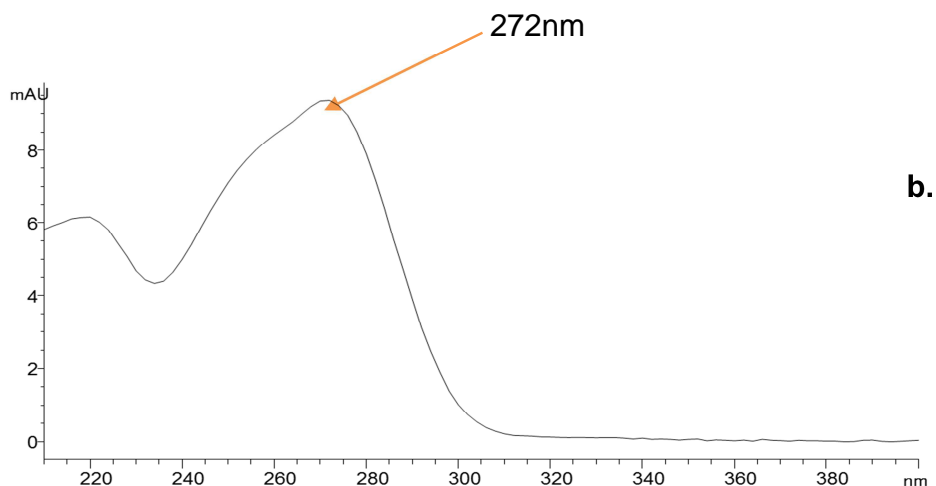


Figura 30. Espectro ultravioleta-visible obtenido en un cromatógrafo líquido AT 1200 con detector de arreglo de diodos, columna zorbax C18 RP. **a.** mancozeb **b.** propineb.

Tabla 27. Parámetros cromatográficos empleados en el presente trabajo para el análisis de mancozeb y propineb por HPLC/DAD.

Parámetros	Especificaciones
Longitud de onda de máxima absorción	272 nm
Flujo	1 mL/min
Fase móvil	H ₂ O : Acetonitrilo (60:40)
Temperatura	35 °C
Volumen de inyección	20 µL
Columna	ZORBAX Eclipse XDB-C18(4,6 mm x 150 mm x 5 µm)

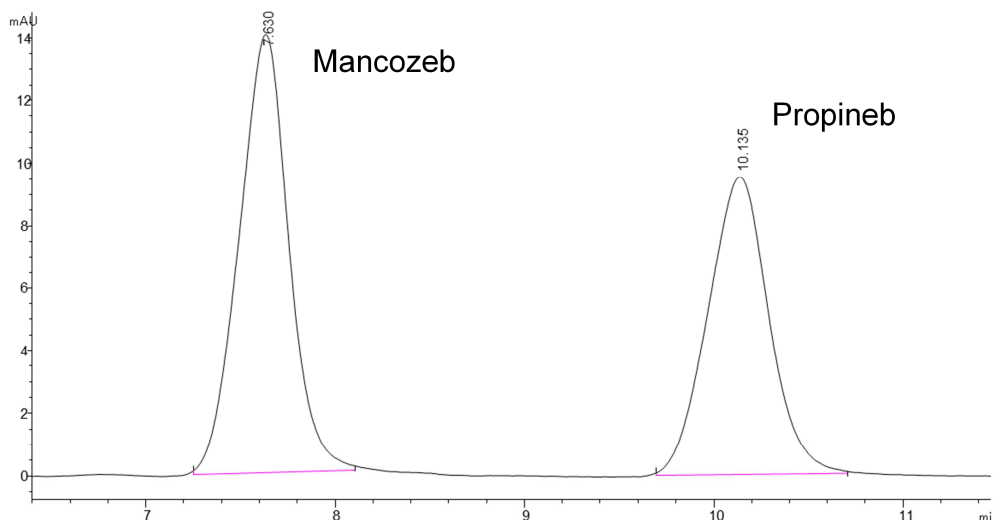


Figura 31. Perfil cromatográfico del mancozeb y propineb (272 nm) obtenido por HPLC – DAD, Columna C₁₈ RP, utilizando las condiciones descritas en la **Tabla 27**; Mezcla de pesticidas de 1 µg/mL.

5.4 PARÁMETROS DE EFICIENCIA DE LA SEPARACIÓN

En la **Tabla 27** se reportan los parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica, determinados bajo las condiciones de operación establecidas y calculados a una longitud de onda.

En la **Tabla 28** se observa, que los parámetros de eficiencia están acorde con lo reportado en la literatura, con un valor de α que se encuentra entre $1 < \alpha < 2$, se dice que tiene una buena separación cromatográfica, además el valor de la resolución es mayor de 1,5 lo que confirma que se obtuvieron picos bien delimitados [48 - 55]. Los parámetros cromatográficos seleccionados, por ende, fueron apropiados para la separación de los pesticidas.

Tabla 28. Eficiencia de la separación de los pesticidas analizados. Utilizando los parámetros operacionales reportados en la **Tabla 27**.

Longitud de onda, nm.	Pesticida	t _R , min	W _b , min	N	σ	k'	R _s
272	Mancozeb	7,637		3380	-	0,3	-
272	Propineb	10,170	0,38	21423	1,4	15,0	16,7

N: Número de platos teóricos; σ: Factor de selectividad; k': Factor de retención; R_s: Resolución.

5.5 FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO PARA HPLC/DAD

5.5.1 Evaluación de la repetibilidad del método cromatográfico para tiempos de retención (t_R) y áreas. Al inyectar tres veces una mezcla de pesticidas (20 μL, 1 ppm), se determinó la repetibilidad del método cromatográfico. Los resultados de la evaluación de la repetibilidad de t_R y áreas de los picos cromatográficos, se observan en las **Tablas 29** y **30**, respectivamente.

Tabla 29. Repetibilidad de los t_R de los pesticidas analizados por HPLC/DAD.

Pesticida	t _R , min			— X	S	CV, %
	Medida 1	Medida 2	Medida 3			
Mancozeb	7,692	7,630	7,631	7,65	0,04	0,5
Propineb	10,220	10,135	10,136	10,16	0,05	0,5

n =3 réplicas.

Tabla 30. Repetibilidad de las áreas cromatográficas de los picos para los pesticidas analizados por HPLC/DAD.

Pesticida	Área, mAU*s			\bar{X}	S	CV, %
	Medida 1	Medida 2	Medida 3			
Mancozeb	240,189	260,111	250,642	250	10	4,0
Propineb	215,255	216,211	214,869	215,4	0,7	0,3

n =3 réplica; mAU*s : unidades de absorbancia por segundos.

En las **Tablas 29** y **30** se observa que los coeficientes de variación, CV, no superaron el 5% para la medición de áreas y t_R , y cumplen con lo recomendado por las GLP [84].

5.5.2 Evaluación del RDL y de la sensibilidad del método. El RDL y la sensibilidad se determinaron con base en los datos obtenidos de la curva de calibración, para cada uno de los pesticidas analizados (ver **Anexo 1**). En la **Tabla 31**, se muestra, para cada pesticida, la ecuación de la curva de calibración, el coeficiente de determinación, R^2 , que mide el ajuste de la curva para el rango de concentraciones evaluado (10 – 2000 ppb) para el mancozeb y el propineb; la pendiente de la curva (factor de respuesta, R_f) y la desviación estándar de la pendiente (evaluando, el área de respuesta), que miden la sensibilidad del método.

Tabla 31. Ecuaciones de la curva de calibración; Coeficientes de determinación, R^2 , pendiente y desviaciones estándar de la pendiente, obtenidos en la determinación de los pesticidas a partir de la curva de calibración (10 – 2000 ppb) para el mancozeb y el propineb, por HPLC/DAD.

Pesticida	Ecuación	R	R_f^*	S_{Rf}^*	$R_f \pm tS_{Rf}$
Mancozeb	$y = 22,73x + 10,435$	0,999	22,73	0,08	$22,7 \pm 0,1$
Propineb	$y = 21,755x - 0,3488$	0,999	21,755	0,21	$21,7 \pm 0,4$

* R_f : Pendiente S_{Rf} : Desviación estándar de la pendiente t: 2,57 para un 95% de confianza.

En la **Tabla 31**, se observa que el R^2 se encuentra en el rango de 0.998-0.999, para las curvas de calibración obtenidas en el intervalo evaluado, lo que indica un buen ajuste de los parámetros. Por tanto, el RDL del método implementado fue de (10 – 2000 ppb) para el mancozeb y el propineb. La sensibilidad del método se determinó como la pendiente de la curva de calibración.

5.5.3 Determinación de los niveles mínimos de detección (NMD) y cuantificación (NMC). Para la determinación del NMD y NMC del método cromatográfico se siguieron los criterios descritos en la secciones **2.7.4 - 2.7.5**. En la **Tabla 32** se observan los NMD y NMC para cada una de los pesticidas estudiados.

Tabla 32. Niveles mínimos de detección y de cuantificación para los pesticidas mancozeb y propineb

Pesticida	NMD, $\mu\text{g/L}$	NMC, $\mu\text{g/L}$
Mancozeb	0,11	0,20
Propineb	0,09	0,11

5.5.4 Exactitud del método. Con base en las condiciones del método de extracción, se realizó la evaluación del porcentaje de recuperación. Se utilizó el procedimiento de extracción de pesticidas en tres muestras de moras libres de pesticidas y enriquecidas con pesticidas en una concentración determinada (ver sección **3.2.4**), se obtuvieron los resultados reportados en la **Tabla 33**.

Tabla 33. Porcentaje de recuperación de la mezcla de pesticidas adicionada a tres muestras de mora sin pesticidas.

Pesticida	Mora libre de pesticidas	Áreas (mAU*s) inicial	Áreas (mAU*s) recuperada			Promedio	Porcentaje de recuperación	
			Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		Promedio, %	
Mancozeb	0	1,506	1,058	1,188	1,158	1,135	75	±4,0
Propineb	0	1,471	1,247	1,405	1,365	1,339	91	±6,0

Como se observa en la **Tabla 33**, los porcentajes de recuperación de los pesticidas fueron aceptables (75–91 %).

5.5.5 Determinación de la reproducibilidad de la extracción. Para calcular la reproducibilidad de la extracción, se realizó la preparación de la muestra de mora enriquecida con los pesticidas bajo estudio por triplicado. La reproducibilidad fue evaluada como el CV, % (**Tabla 34**).

Tabla 34. Reproducibilidad de la extracción para el análisis de una muestra de mora enriquecida.

Pesticida	Porcentaje de recuperación,			— X	S	CV, %
	%					
	Medida 1	Medida 2	Medida 3			
Mancozeb	70	79	77	75	4,0	6,0
Propineb	85	96	93	91	6,0	6,2

En la **Tabla 34** se observan los coeficientes de variación de la recuperación de mancozeb y propineb, que se encuentran en el rango de 6,0–6,2 %, y cumplen con las GLP [85].

5.6 EXTRACCIÓN DE PESTICIDAS EN MUESTRAS COMERCIALES

Una vez implementada la metodología de extracción y el análisis de los pesticidas, se analizaron muestras de mora adquiridas en el mercado local.

En las **Figuras 32-34**, se observan los perfiles cromatográficos típicos de los pesticidas aislados de diferentes muestras de mora, analizados por HPLC-DAD en columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 RP. Las condiciones cromatográficas están descritas en la **Tabla 27** y el procedimiento de preparación de la muestra en la **sección 2.8**.

A continuación se reportan las concentraciones de mancozeb y propineb en las muestras analizadas, teniendo en cuenta los porcentajes de recuperación y los niveles mínimos de detección del método.

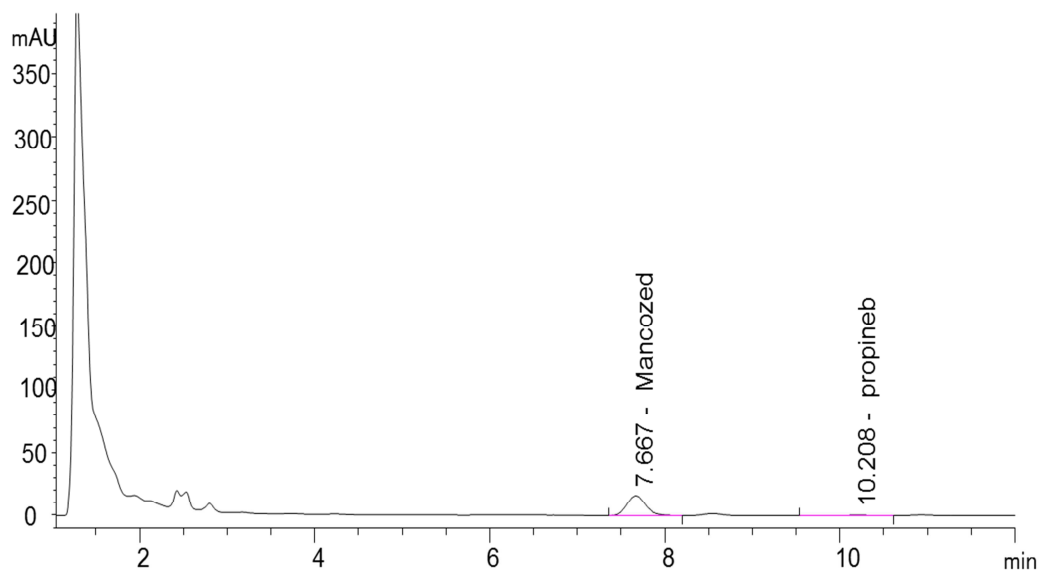


Figura 32. Perfil cromatográfico del extracto de mora M1 (272 nm), para la determinación de mancozeb y propineb, analizados por HPLC-DAD. Columna ZORBAX Eclipse XDB-C18.

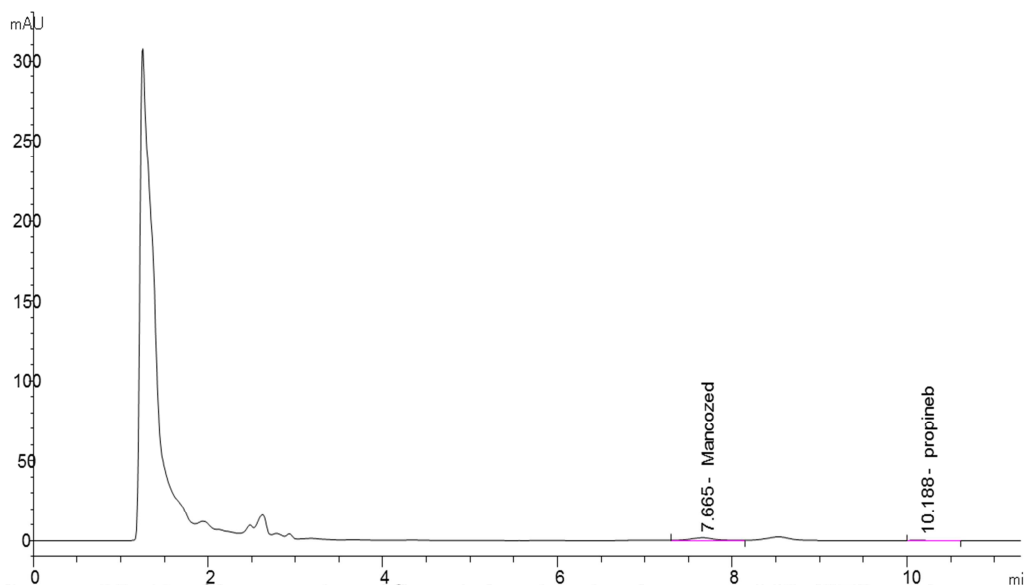


Figura 33. Perfil cromatográfico del extracto de mora M2 (272 nm), para la determinación de mancozeb y propineb, analizados por HPLC-DAD. Columna ZORBAX Eclipse XDB-C18.

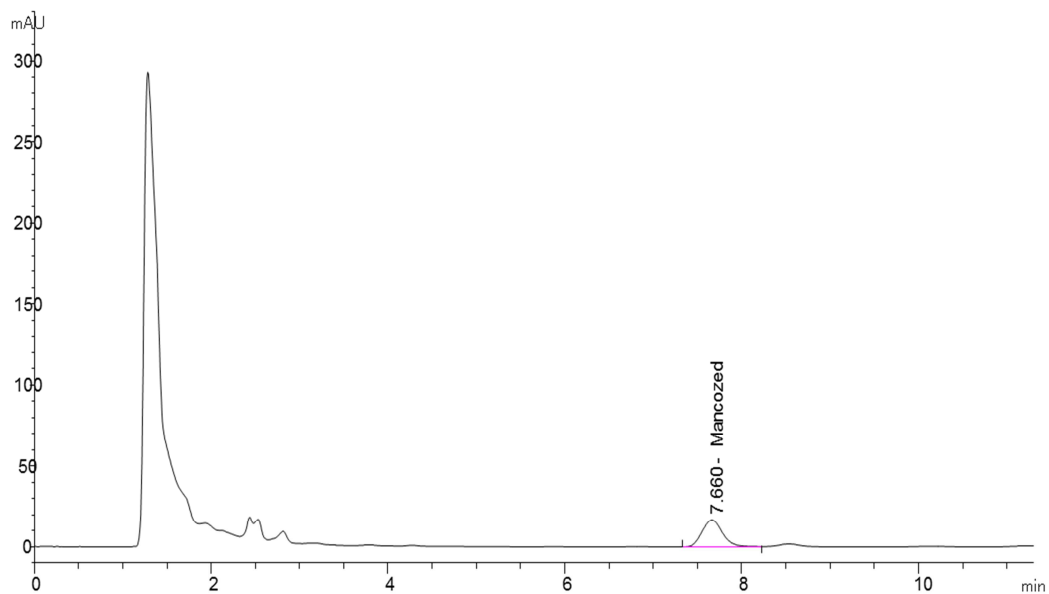


Figura 34. Perfil cromatográfico del extracto de mora M3 (272 nm), para la determinación de mancozeb y propineb, analizados por HPLC-DAD. Columna ZORBAX Eclipse XDB-C18.

Tabla 35. Concentraciones de mancozeb y propineb ($\mu\text{g/g}$) halladas en las muestras de mora analizadas por HPLC-DAD, columna ZORBAX Eclipse XDB-C18, y niveles mínimos residuales permitidos.

Pesticida	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MUESTRA 3	NMR*
	$\mu\text{g/g}$ ($\pm\text{S}$)	$\mu\text{g/g}$ ($\pm\text{S}$)	$\mu\text{g/g}$ ($\pm\text{S}$)	$\mu\text{g/g}$
Mancozeb	13,0 \pm 0,1	<0,3 \pm 0,1	3,4 \pm 0,1	5
Propineb	0,5 \pm 0,4	<0,2 \pm 0,4	<0,2 \pm 0,4	5

*NMR: Nivel mínimo residual, *Codex alimentarius* FAO y OMS 2010.

En la **Tabla 35** se presenta un resumen de los resultados obtenidos en la aplicación de la metodología sobre muestras reales. En estos resultados se observa que el mancozeb y el propineb se encontraban en las muestras de mora, también se observa que en la muestra M1 el mancozeb está 2,6 veces por encima de los NMR permitidos.

Se observa también que los niveles residuales permitidos están por encima de los niveles mínimos de detección y de cuantificación del equipo.

CONCLUSIONES

Las metodologías implementadas para el análisis de benomil, carbendazim, clorpirifos, clorotalonil, imidacloprid, dimetoato, propineb, mancozeb y tebuconazol por las técnicas analíticas GC-ECD, HPLC/DAD cumplen con los requerimientos establecidos por las Buenas Prácticas de Laboratorio, y aseguran, de esta manera, la calidad y la confianza en los resultados y, por ende, su aplicación para el análisis de pesticidas en mora castilla.

Para la determinación de dimetoato, clorpirifos, clorotalonil y tebuconazol se utilizó GC-ECD el cual presentó niveles de detección entre 0,01–0,15 ppb y niveles de cuantificación entre 0,08-0,40 ppb, con porcentajes de recuperación entre 93 y 112 %.

Para el carbendazim, el imidacloprid y el benomil se utilizó HPLC-DAD y se obtuvieron niveles mínimos de detección entre 0,07-0,11 ppb, y niveles mínimos de cuantificación entre 0,11-0,20 ppb. Los porcentajes de recuperación fueron superiores al 75% para el carbendazim y el imidacloprid, mientras que en el benomil se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 64-67%.

Se comprobó que los solventes orgánicos y el pH básico hacen que el benomil se degrade convirtiéndose en carbendazim; por lo tanto su determinación debe realizarse a pH ácido.

Se observó que la técnica DMSP es una técnica de preparación de la muestra rápida y que presenta altos porcentajes de recuperación

El mancozeb y el propineb se derivatizaron, y posteriormente se determinaron por HPLC-DAD, obteniendo niveles mínimos de detección del mancozeb y el propineb de 0,09 y 0,11 ppb respectivamente con niveles mínimos de cuantificación de 0,11 y 0,20 ppb, los porcentajes de recuperación fueron superiores al 75%.

En el análisis de las muestras de mora de castilla obtenidas en el mercado local, se determinó que el tebuconazol, el carbendazim, el mancozeb y el propineb estaban por encima del nivel mínimo de detección del equipo cromatográfico.

En la comparación de los resultados obtenidos, con los niveles mínimos residuales permitidos; se observó que en las muestras de mora del mercado local el tebuconazol, el carbendazim y el mancozeb estuvieron por encima del nivel mínimo residual permitido por el *Codex alimentarius* FAO y OMS 2010.

RECOMENDACIONES

La implementación de estos métodos cromatográficos abre las puertas para que los cultivadores de mora puedan conocer la concentración de los pesticidas en los frutos que comercializan.

Se recomienda a trabajos futuros la validación de estas metodologías realizando la comparación con la norma y calculando la incertidumbre de los métodos.

Para la determinación del benomil es importante que durante todo el proceso de preparación de la muestra el pH sea ácido.

Las metodologías implementadas podrían servir en la determinación de estos pesticidas en diferentes matrices, por ejemplo tomate, lulo, fresas etc. Por tal razón se recomienda la evaluación de la robustez de las metodologías en estas matrices.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Colombia. Ministerio de salud pública. Decreto 1843 de 1991: Uso y manejo de pesticidas. Bogotá: Ministerio de Salud, **1991**; pp. 1-14.
2. BARBERÁ, C.; Pesticidas Agrícolas, Barcelona: Ediciones Omega, 4^a edición, **1989**, pp. 5-17.
3. FERNÁNDEZ, F.M.; Aplicación de Plaguicidas. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Madrid: Mundi-Prensa, **2002**, pp. 12-50.
4. PLIMMER, J.R.; Handbook of pesticide toxicology: Chemistry of pesticides. New York: Academic Press Inc, **2002**; pp. 95-107.
5. KAMRIN, M. A.; Pesticides profiles: Toxicity, environmental impact and fate. Florida: ed. Lewis Publishers, **1997**; pp. 135-139, 239-243.
6. ZHAO, Q., DOURSON, M. and GADAGBUI, B.; A review of the reference dose for chlorpyrifos. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **2006**; 44, pp. 111-24.
7. U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). Ambient Water Quality Criteria for Chlorpyrifos., **1986**; U.S. Environ. Protection Agen. Rep. 440/5-86-005. 64 p.
8. HUGHES, J.M., HARRISON, D.A. and ARTHUR. J.M.; Genetic variation at the *Pg locus* in the mosquito fish *Gambusia affinis* (Poeciliidae) and a possible effect on susceptibility to an insecticide. *Biol. J. Linnean. Soc.*, **1991**; 44, pp. 153-167.
9. U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). Preliminary Quantitative Use Analysis. **1982**; U.S. Environ. Protection Agen.,

Economics Analysis Branch, 401 M St. S.W., Washington D.C., 20460. 10 p.

10. FREED, V.H., CHIOU, C.T. and SCHMEDDING, D.W.; Degradation of selected organophosphate pesticides in water and soil. *J. Agric. Food Chem.*, **1979**; 27, pp. 706-708.
11. SCHIMMEL, S.C., GARNES, R.L., PATRICK J.M. and MOORE, J.C.; Acute toxicity, bioconcentration, and persistence of AC 222, 705, benthocarb, chlorpyrifos, fenvalerate, methyl parathion, and permethrin in the estuarine environment. *J. Agric. Food Chem.*, **1983**; 31, pp. 104-113.
12. MULLA, M.S., NORLAND, R.L. and FANUVA. D.M.; Control of chironomid midges in recreational lakes. *J. Econ. Entomol.*, **1971**; 64 pp. 300-307.
13. HOY, J.B. and SHEA, P.J.; Effects of lindane, chlorpyrifos, and carbaryl on a California pine forest soil arthropod community. *Environ. Entomol.*, **1981**; 10, pp. 732-740.
14. KRIEGER, R.I. and KRIEGER, W.C.; Handbook of pesticide toxicology. Elsevier Inc 2^a ed., **2001**; 80, pp. 1743-1757.
15. TURNER, N.J., LINPEL, L.E., BATTERSHELL, R.D., BLUESTONE, H. and LARNONT, D.; A new foliage protectant fungicide, tetrachloroisophthalonitrile. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **1964**; 22, pp. 303-310.
16. LOEFFLER, R.S.T.; Identification of the photochemical decomposition product of chlorothalonil by ¹³C n.m.r. spectroscopy. *J. Pestic. Sci.*, **1978**; 9, pp. 310-312.
17. VINCENT P.G. and SISLER H.D.; Mechanism of antifungal action of 2,4,5,6 tetrachloroisophthalonitrile. *Plant. Physiol.*, **1968**; 21, pp. 1249-1264.

18. SZALKOWSKI, M.H. and STALLARD, D.E.; Effect of pH on the hydrolysis of chlorothalonil. *J. Agric. Food Chem.* **1977**; 25, pp. 208-210.
19. Pesticide residues in food – Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Tebuconazole (188), **1994**; pp. 1055-1098.
20. Interpretation of criteria for approval of active substances in the proposed EU plant protection regulation. Swedish Chemicals Agency (KemI). 2008-09-23. Retrieved 2009-01-14. pp. 1-14.
21. CASSADAY, J.T., HOEGBERG, E.I. and GLEISSNER, B.D.; Carbamylalkyl phosphates and method of preparation. US Pat. 2494283, June 10 **1950**; pp. 1-4.
22. KHERA, K.S.; Teratogenicity evaluation of commercial formulation of dimethoate (Cygon 4F) in the cat and rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1979**; 48, A34.
23. SCHEUFLEER, H.; Effects of relatively high doses of dimethoate and trichlorfon on the embryogenesis of laboratory mice. *Biol. Rundsch.*, **1975**; 13, pp. 238-240.
24. SCHEUFLEER, H.; Experimental testing of chemical agents for embryo toxicity, teratogenicity and mutagenicity - ontogenic reactions of the laboratory mouse to these injections and their evaluation - a critical analysis method. *Biol. Rundsch.*, **1976**, 14, pp. 227-229.
25. COURTNEY, K.D., ANDREWS, J.E., SPRINGER, J. and DALLEY, L.; Teratogenic evaluation of pesticides baygon, carbofuran, dimethoate and EPN. *J. Environ. Sci. Health B.*, **1985**; 20, pp. 373-406.
26. BUDREAU, C.H. and SINGH, R.P.; Effect of Fenthion and Dimethoate on reproduction in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1973**; 26, pp. 29-38.

27. ELBER, A., BECKER, B., HARTWIIG, J. and ERDELEN, C.; Imidacloprid –A new systemic insecticide. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer.*, **1991**; 44, pp. 113-136.
28. MINAMIDA, I., IWANAGA, K., TABUCHI, T., AOKI, I., FUSAKA, T., ISHIZUKA, H. and OKAUCHI, T.; Synthesis and insecticidal activity of acyclic nitroethene compounds containing a heteroarylamino group. *J Pestic. Sci.*, **1993**; 18, pp. 41-48.
29. BAI, D., LUMMIS, S. C. R., LEICHT, W., BREER, H. and SATTELLE, D. B.; Actions of imidacloprid and a related nitromethylene on cholinergic receptor of an identified insect motor neurone. *Pestic. Sci.*, **1991**; 33, pp. 197-204.
30. CHAO, S. L. and CASIDA J. E.; Interaccion of imidacloprid metabolites and analogs with the nicotinic acetylcholine receptor of mouse brain in relation to toxicity Pesticide. *Biochem. Physiol.*, **1997**; 58, pp. 77-88.
31. BUCKINGHAM, S. D., BALK, M. L., LUMMIS, S. C. R., JEWESS, P. and SATTELLE, D. B.; Actions of nitromethylenes on a α -bungarotoxin – sensitive neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Neuropharmacology*, **1995**; 34, pp. 591-597.
32. DELP, C.J. and KLOPPING, H.L.; Performance attributes of a new fungicide and mite ovicide candidate. *Plant Dis. Rep.*, **1968**; 52, pp. 95-99.
33. CLEMONS, G.P. and SISLER, H.D.; Formation of a fungitoxic derivative from benlate. *Phytopathology*, **1969**; 59, pp. 705-706.
34. PETERSON, C.A. and EDGINGTON, L.V.; Transport of benomyl into various plant organs. *Phytopathology*, **1971**; 61, pp. 91-92.
35. MATOLCSY, G., NÁDASY, M. and ANDRISCA, V.; Studies in environmental science 32 pesticide chemistry, Amsterdam: Elsevier science publishers, **1988**; pp. 389- 395.

36. HAMPEL, M. and LIICHER. F.; Proceedings 7th British Insecticide and Fungicide Conference Brighton. Nottingham: The Boots Co. Ltd., **1973**; 1, 127 p.
37. BONTOYAN, W.R. and LOOKER, J.; Degradation of commercial ethylene bisdithiocarbamate formulations to ethylenethiourea under elevated temperature and humidity. *J. Agric. Food Chem.*, **1973**; 8, pp. 21, 338.
38. HIGO, A., OTHAKE, N., SARUWATARI, K. and KANZAKI, T.; Photoallergic contact dermatitis from Mancozeb, an agricultural fungicide. *Contact Dermatitis*, **1996**; 35, 183 p.
39. KASLANDER, J., KAARS S.A. and VAN DER KERK, G.J.M.; On the transformation of the fungicide sodium dimethyl-dithiocarbamate into its alanine derivative by plant tissues. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1962**; 60, pp.417-419.
40. KASLANDER, J. Metabolic Fate of Dithiocarbamates. *Doctoral Thesis*, Univ. Utrecht, **1966**, 96 p.
41. KAZOS E.A.; STALIKAS C.D., NANOS C. G. and KONIDARI C.N.; Determination of dithiocarbamate fungicide propineb and its main metabolite propylenethiourea in airborne samples. *Chemosphere*, **2007**, 68, pp. 2104–2110.
42. RICHARDSON, M.L. and GANGOLLI, S.; The Dictionary of Substances and their Effects. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, **1997**. Versión digital en <http://www.knovel.com>.
43. XU, G. and ZHENG, W.; Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a newly isolated *Paracoccus* sp. Strain TRP. *Int. Biodeter. Biodegr.*, **2008**; 62 pp.51–56.
44. GUARDINO, X., OBIOLS, J., ROSELL, M.G., FARRAN, A. and SERRA, C.; Determination of chlorpyrifos in air, leaves and soil from a greenhouse by gas-chromatography with nitrogen–phosphorus

detection, high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis X. *J. Chromatogr. A*. Short communication, **1998**; 823, pp. 91–96.

45. LORES, E.M., SOVOCOL, G.W., HARLESS, R.L., WILSON, N.K. and MOSEMAN R.F.; A New Metabolite of Chlorpyrifos: Isolation and Identification. *J. Agric. Food Chem.*, **1978**; 26, pp. 1.
46. BOG SOILS KAREN M. ERSTFELD and CHIA-YANG CHEN.; Comparison of Supercritical Fluid and Soxhlet Extraction Methods for the Determination of Chlorothalonil from Cranberry. *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, pp. 499-503.
47. TOPUZ S.; Simultaneous determination of various pesticides in fruit juices by HPLC-DAD. *Food Control.*, **2005**; 16, pp. 87–92.
48. YOUNG, W.L. and NEIL, D.W.; Gas Chromatographic Quantitative Analysis and Persistence of Dimethoate and Dimethoxon Residues on and in Wheat Plants. *J. Agric. Food Chem.*, **1981**; 29, pp.4.
49. ATHANASOPOULOS P.; Effect of Storage Temperature on the Degradation of Dimethoate in Fortified Orange and Peach Juices. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**; 48, pp. 4896-4899.
50. RISSATO, S.R., MAÄ, R.S., APON, B.M. and ARRUDA, S.P.; Multiresidue Analysis of Pesticides in Soil by Supercritical Fluid Extraction/Gas Chromatography with Electron-Capture Detection and Confirmation by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, pp. 62-69.
51. ZHUBO D.; Simultaneous Analysis of Hexaconazole, Myclobutanil, and Tebuconazole Residues in Apples and Soil by SPE Clean-Up and GC with Nitrogen–Phosphorus Detection, , *Chromatographia*, **2010**; 71, pp.7-8.

52. ISHII, Y. KOBORI, I.; HPLC Determination of the New Insecticide Imidacloprid and Its Behavior in Rice and Cucumber. *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, 42, pp. 2917-2921.
53. TIŠLER, T.; JEMEC A.; MOZETIC B.; TREBŠE P.; Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere*, **2009**, 76, pp.907–914.
54. VENEZIANO, A.; Determination of carbendazim, thiabendazole and thiophanate-methyl in banana (*Musa acuminata*) samples imported to Italy. *Food Chem.*, **2004**; 87, pp. 383–386.
55. BOGUS M.M.; Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the determination analysis of carbendazim residue in plant material. *J. Chromatogr. B*, **2004**; 800, pp. 309-314.
56. ANASTASSIADES, M. SCHWACK, W.; Analysis of carbendazim, benomyl, thiophanate methyl and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in fruits and vegetables after supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. A*, **1998**; 825, pp. 45-54.
57. BERNAL, J.L., NOZAL, M.J.; High-performance liquid chromatographic determination of benomyl and carbendazim residues in apiarian samples. *J. Chromatogr. A*, **1997**; 787, pp.129-136.
58. RAJ, P.S. and MIKIO, C.; Solubility of Benomyl in Water at Different pHs and Its Conversion to Methyl 2-Benzimidazolecarbamate, 3-Butyl-2,4-dioxo[1,2-a 1-s -triazinobenzimidazole, and 1-(2-Benzimidazolyl)-3-n -butylurea. *J. Agric. Food Chem.*, **1985**; 33, pp.63-67.
59. GUSTAFSSON, K.H. and THOMPSON, R.A.; High-pressure Liquid Chromatographic Determination of Fungicidal Dithiocarbamates. *J. Agric. Food Chem.*, **1981**; 29, pp.4.
60. WOODROW, J.E. and SEIBER, J.N.; Analytical Method for the Dithiocarbamate Fungicides Ziram and Mancozeb in Air: Preliminary Field Results. *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43, pp. 1524-1529

61. LO, C., HO, M. and HUNG, M.; Use of High-Performance Liquid Chromatographic and Atomic Absorption Methods To Distinguish Propineb, Zineb, Maneb, and Mancozeb Fungicides. *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, 44, pp. 2720-2723.
62. KAZOS, E.A. and STALIKAS, C.D.; Determination of dithiocarbamate fungicide propineb and its main metabolite propylenethiourea in airborne samples. *Chemosphere*, **2007**; 68, pp.2104–2110.
63. BOHRER, D., DO NASCIMENTO, P.C. and GOMES, H.M.; Improvement in the Determination of Mancozeb Residues by the Carbon Disulfide Evolution Method Using Flow Injection Analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**; 47, pp. 212-216.
64. BLASCO, C. FONT, G. and PICÓ Y.; Determination of dithiocarbamates and metabolites in plants by liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chrom. A*, **2004**; 1028, pp. 267–276.
65. BAUTISTA, D.; Observaciones sobre el cultivo de la mora. (*Rubus glaucus* Benth.) en los andes venezolanos. *Agronomía Tropical*, **1977**, 27, pp.253-260.
66. GARCÍA, D.; Extracción y caracterización del aceite crudo extraído de residuos de mora (*Rubus glaucus* Benth) para su posible uso como aceite comestible, Tesis de Ingeniería de Alimentos, Laboratorio de Biomoléculas, Universidad Simón Rodríguez, Canoabo-Venezuela, **2002**
67. FRANCO, G.; GIRALDO, C.J.; El cultivo de la mora. Proyecto de transferencia tecnología sobre el cultivo de la mora, Corpoica-Pronatta, **1999**, pp.1-39.
68. MORENO, M.J.; VILORIA, A.; LÓPEZ, E.; BELÉN, D.; Estabilidad de antocianinas en jugos pasteurizados de mora (*Rubus glaucus* Benth), *Arch. Lat. Nutr.*, **2002**, 52, pp.181-186.

69. BARKER, S.A.; Matrix solid phase dispersion (MSPD), *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2007**, 70, pp.151-162.
70. BARKER, S.A.; Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 880, pp.63–68.
71. BARKER, S.A.; Matrix solid-phase dispersión. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 885, pp.115–127.
72. GILBERT, B., GARCÍA, J.F., MOLINA, A.; Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review, *Talanta*, **2009**, 79, pp.109-128.
73. HERNÁNDEZ, L.; GONZÁLEZ, C.; Introducción al Análisis Instrumental. Barcelona: 1^{ra} Edición, Editorial Ariel Ciencia, **2002**, pp. 273 – 307.
74. SKOOG, D.A., HOLLER, F.J. and NIEMAN, T.A.; Principios de análisis instrumental. Barcelona: 5^{ta} Edición, McGraw-Hill, **2001**, pp. 382-431, 729-828.
75. KENNDLER, E.; Introduction to chromatography. Austria: Institute for Analytical Chemistry, University of Vienna, **2004**, pp. 1-25.
76. NOLLET, L.M.L.; Food analysis by HPLC. New York: 2^o Edition, Marcel Dekker, Inc., **2000**, pp. 805-846.
77. QUATTROCHI, O.A., ANDRIZZI, S.A., LABA, R.F.; Introducción a la HPLC aplicación y práctica. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro S.A, **1992**, pp. 89-137.
78. ARDREY, R.E.; Liquid chromatography–mass spectrometry. New York: University of Huddersfield, Huddersfield. Wiley, **2003**, pp.200-240.
79. KATZ, E.; Handbook of HPLC. New York: Edition, Marcel Dekker, **1998**, pp. 273-293.
80. SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J. and GIAJCH, J.L.; Practical HPLC method development. New York: 2^o Edition, Wiley, **1997**, pp. 21-125.

81. VERONIKA, M.R.; Pitfalls and errors of HPLC in pictures. Weinheim: 2^o Edition, Edited by Wolfgang Dünge, **1997**, pp. 100-105.
82. SETTLE, F.A.; Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. New Jersey: Prentice, Hall, Inc., **1997**, pp. 994
83. RÖDEL, W., WÖLM, G.; A guide to gas chromatography. Berlín: VEB Deutscher, Verlag der Wissenschaften, **1987**, pp. 15-17.
84. TAYLOR, J.K.; Validation of Analytical Methods. *Anal. Chem.*, **1983**, 55, pp. 600-608.
85. FDA. US Department of health and human services. Guidance for industry bioanalytical Methods, validation for human studies. **1998**, pp.12.
86. GREEN, J.M.; A Practical Guide to Method Validation. *Anal. Chem.*, **1996**, 68, pp. 305-309.
87. MACARENA, M.M., ARAVENA, P.A.A., ANDONAEGUI, M.T.; Validación de la metodología analítica para la cuantificación de sodio y potasio por fotometría de llama, en soluciones parenterales de gran volumen, Santiago, Chile: Laboratorio B.BRAUN MEDICAL, **2004**, pp. 23-26.
88. ARAUJO, R.J.A., ARENCIBIA, J.R.; Informetría, bibliometría y cienciometría: aspectos teórico-prácticos. ACIMED, **2002**, 10, pp. 5-6.
89. SPINAK, E. Diccionario Enciclopédico de Bibliometría, Cienciometría e Informetría, Caracas: UNESCO, 1996, pp. 34 -131. HORWITZ, W.; Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. *Anal. Chem.*, **1982**, 54, p.p.67.
90. BOX, G.E.P., HUNTER, W.G., HUNTER, J.S. Estadística para experimentadores. Barcelona: Ed. Reverté. **1989**, p.p 250-279.
91. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. Association of official analytical chemists AOAC 990.16. 18th Edition, Inc. Washington, D.C. **2005**.

92. KAWAMOTO, T., YANO, M., MAKIHATA, N.; Development of a high-sensitivity quantitative analytical method for determining polycarbamate by gas chromatography-mass spectrometry incorporating temperature-programmable inlet on-column injection. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1074, p.p 155–161.

BIBLIOGRAFÍA

ANASTASSIADES, M. SCHWACK, W.; Analysis of carbendazim, benomyl, thiophanate methyl and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in fruits and vegetables after supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. A*, **1998**; 825, pp. 45-54.

ARAUJO, R.J.A., ARENCIBIA, J.R.; Informetría, bibliometría y cienciometría: aspectos teórico-prácticos. ACIMED, **2002**, 10, pp. 5-6.

ARDREY, R.E.; Liquid chromatography–mass spectrometry. New York: University of Huddersfield, Huddersfield. Wiley, **2003**, pp.200-240.

ATHANASOPOULOS P.; Effect of Storage Temperature on the Degradation of Dimethoate in Fortified Orange and Peach Juices. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**; 48, pp. 4896-4899.

BAI, D., LUMMIS, S. C. R., LEICHT, W., BREER, H. and SATTELLE, D. B.; Actions of imidacloprid and a related nitromethylene on cholinergic receptor of an identified insect motor neurone. *Pestic. Sci.*, **1991**; 33, pp. 197-204.

BARBERÁ, C.; Pesticidas Agrícolas, Barcelona: Ediciones Omega, 4ª edición, **1989**, pp. 5-17.

BARKER, S.A.; Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 880, pp.63–68.

BARKER, S.A.; Matrix solid phase dispersion (MSPD), *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2007**, 70, pp.151-162.

BARKER, S.A.; Matrix solid-phase dispersión. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 885, pp.115–127.

BAUTISTA, D.; Observaciones sobre el cultivo de la mora. (*Rubus glaucus* Benth.) en los andes venezolanos. *Agronomía Tropical*, **1977**, 27, pp.253-260.

BERNAL, J.L., NOZAL, M.J.; High-performance liquid chromatographic determination of benomyl and carbendazim residues in apiarian samples. *J. Chromatogr. A*, **1997**; 787, pp.129-136.

BLASCO, C. FONT, G. and PICÓ Y.; Determination of dithiocarbamates and metabolites in plants by liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chrom. A*, **2004**; 1028, pp. 267–276.

BOG SOILS KAREN M. ERSTFELD and CHIA-YANG CHEN.; Comparison of Supercritical Fluid and Soxhlet Extraction Methods for the Determination of Chlorothalonil from Cranberry. *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, pp. 499-503.

BOGUS M.M.; Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the determination analysis of carbendazim residue in plant material. *J. Chromatogr. B*, **2004**; 800, pp. 309-314.

BOHRER, D., DO NASCIMENTO, P.C. and GOMES, H.M.; Improvement in the Determination of Mancozeb Residues by the Carbon Disulfide Evolution Method Using Flow Injection Analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**; 47, pp. 212-216.

BONTOYAN, W.R. and LOOKER, J.; Degradation of commercial ethylene bisdithiocarbamate formulations to ethylenethiourea under elevated temperature and humidity. *J. Agric. Food Chem.*, **1973**; 8, pp. 21, 338.

BOX, G.E.P., HUNTER, W.G., HUNTER, J.S. Estadística para experimentadores. Barcelona: Ed. Reverté. **1989**, p.p 250-279.

BUCKINGHAM, S. D., BALK, M. L., LUMMIS, S. C. R., JEWESS, P. and SATTELLE, D. B.; Actions of nitromethylenes on a α -bungarotoxin – sensitive neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Neuropharmacology*, **1995**; 34, pp. 591-597.

BUDREAU, C.H. and SINGH, R.P.; Effect of Fenthion and Dimethoate on reproduction in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1973**; 26, pp. 29-38.

CASSADAY, J.T., HOEGBERG, E.I. and GLEISSNER, B.D.; Carbamylalkyl phosphates and method of preparation. US Pat. 2494283, June 10 **1950**; pp. 1-4.

CHAO, S. L. and CASIDA J. E.; Interaccion of imidacloprid metabolites and analogs with the nicotinic acetylcholine receptor of mouse brain in relation to toxicity Pesticide. *Biochem. Physiol.*, **1997**; 58, pp. 77-88.

CLEMONS, G.P. and SISLER, H.D.; Formation of a fungitoxic derivative from

benlate. *Phytopathology*, **1969**; 59, pp. 705-706.

Colombia. Ministerio de salud pública. Decreto 1843 de 1991: Uso y manejo de pesticidas. Bogotá: Ministerio de Salud, **1991**; pp. 1-14.

COURTNEY, K.D., ANDREWS, J.E., SPRINGER, J. and DALLEY, L.; Teratogenic evaluation of pesticides baygon, carbofuran, dimethoate and EPN. *J. Environ. Sci. Health B.*, **1985**; 20, pp. 373-406.

DELP, C.J. and KLOPPING, H.L.; Performance attributes of a new fungicide and mite ovicide candidate. *Plant Dis. Rep.*, **1968**; 52, pp. 95-99.

ELBER, A., BECKER, B., HARTWIIG, J. and ERDELEN, C.; Imidacloprid –A new systemic insecticide. *Pflanzenschutz- Nachrichten Bayer.*, **1991**; 44, pp. 113-136.

FDA. US Department of health and human services. Guidance for industry bioanalytical Methods, validation for human studies. **1998**, pp.12.

FERNÁNDEZ, F.M.; Aplicación de Plaguicidas. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Madrid: Mundi-Prensa, **2002**, pp. 12-50.

FRANCO, G.; GIRALDO, C.J.; El cultivo de la mora. Proyecto de transferencia tecnología sobre el cultivo de la mora, Corpoica-Pronatta, **1999**, pp.1-39.

FREED, V.H., CHIOU, C.T. and SCHMEDDING, D.W.; Degradation of selected organophosphate pesticides in water and soil. *J. Agric. Food Chem.*, **1979**; 27, pp. 706-708.

GARCÍA, D.; Extracción y caracterización del aceite crudo extraído de residuos de mora (*Rubus glaucus* Benth) para su posible uso como aceite comestible, Tesis de Ingeniería de Alimentos, Laboratorio de Biomoléculas, Universidad Simón Rodríguez, Canoabo-Venezuela, **2002**.

GILBERT, B., GARCÍA, J.F., MOLINA, A.; Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review, *Talanta*, **2009**, 79, pp.109-128.

GREEN, J.M.; A Practical Guide to Method Validation. *Anal. Chem.*, **1996**, 68, pp. 305-309.

GUARDINO, X., OBIOLS, J., ROSELL, M.G., FARRAN, A. and SERRA, C.; Determination of chlorpyrifos in air, leaves and soil from a greenhouse by gas-chromatography with nitrogen–phosphorus detection, high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis X. *J. Chromatogr. A*. Short communication, **1998**; 823, pp. 91–96.

GUSTAFSSON, K.H. and THOMPSON, R.A.; High-pressure Liquid Chromatographic Determination of Fungicidal Dithiocarbamates. *J. Agric. Food Chem.*, **1981**; 29, pp.4.

HAMPEL, M. and LIICHER. F.; Proceedings 7th British Insecticide and Fungicide Conference Brighton. Nottingham: The Boots Co. Ltd., **1973**; 1, 127 p.

HERNÁNDEZ, L.; GONZÁLEZ, C.; Introducción al Análisis Instrumental. Barcelona: 1^{ra} Edición, Editorial Ariel Ciencia, **2002**, pp. 273 – 307.

HIGO, A., OTHAKE, N., SARUWATARI, K. and KANZAKI, T.; Photoallergic contact dermatitis from Mancozeb, an agricultural fungicide. *Contact Dermatitis*, **1996**; 35, 183 p.

HOY, J.B. and SHEA, P.J.; Effects of lindane, chlorpyrifos, and carbaryl on a California pine forest soil arthropod community. *Environ. Entomol.*, **1981**; 10, pp. 732-740.

HUGHES, J.M., HARRISON, D.A. and ARTHUR, J.M.; Genetic variation at the *Pg locus* in the mosquito fish *Gambusia affinis* (Poeciliidae) and a possible effect on susceptibility to an insecticide. *Biol. J. Linnean. Soc.*, **1991**; 44, pp. 153-167.

Interpretation of criteria for approval of active substances in the proposed EU plant protection regulation. Swedish Chemicals Agency (KemI). 2008-09-23. Retrieved 2009-01-14. pp. 1-14.

ISHII, Y. KOBORI, I.; HPLC Determination of the New Insecticide Imidacloprid and Its Behavior in Rice and Cucumber. *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, 42, pp. 2917-2921.

KAMRIN, M. A.; Pesticides profiles: Toxicity, environmental impact and fate. Florida: ed. Lewis Publishers, **1997**; pp. 135-139, 239-243.

KASLANDER, J. Metabolic Fate of Dithiocarbamates. *Doctoral Thesis*, Univ. Utrecht, **1966**, 96 p.

KASLANDER, J., KAARS S.A. and VAN DER KERK, G.J.M.; On the transformation of the fungicide sodium dimethyl-dithiocarbamate into its alanine derivative by plant tissues. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1962**; 60,

pp.417-419.

KATZ, E.; Handbook of HPLC. New York: Edition, Marcel Dekker, **1998**, pp. 273-293.

KAWAMOTO, T., YANO, M., MAKIHATA, N.; Development of a high-sensitivity quantitative analytical method for determining polycarbamate by gas chromatography-mass spectrometry incorporating temperature-programmable inlet on-column injection. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1074, p.p 155–161.

KAZOS E.A.; STALIKAS C.D., NANOS C. G. and KONIDARI C.N.; Determination of dithiocarbamate fungicide propineb and its main metabolite propylenethiourea in airborne samples. *Chemosphere*, **2007**, 68, pp. 2104–2110.

KAZOS, E.A. and STALIKAS, C.D.; Determination of dithiocarbamate fungicide propineb and its main metabolite propylenethiourea in airborne samples. *Chemosphere*, **2007**; 68, pp.2104–2110.

KENNDLER, E.; Introduction to chromatography. Austria: Institute for Analytical Chemistry, University of Vienna, **2004**, pp. 1-25.

KHERA, K.S.; Teratogenicity evaluation of commercial formulation of dimethoate (Cygon 4F) in the cat and rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1979**; 48, A34.

KRIEGER, R.I. and KRIEGER, W.C.; Handbook of pesticide toxicology. Elsevier Inc 2^a ed., **2001**; 80, pp. 1743-1757.

LO, C., HO, M. and HUNG, M.; Use of High-Performance Liquid Chromatographic and Atomic Absorption Methods To Distinguish Propineb, Zineb, Maneb, and Mancozeb Fungicides. *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, 44, pp. 2720-2723.

LOEFFLER, R.S.T.; Identification of the photochemical decomposition product of chlorothalonil by ^{13}C n.m.r. spectroscopy. *J. Pestic. Sci.*, **1978**; 9, pp. 310-312.

LORES, E.M., SOVOCOL, G.W., HARLESS, R.L., WILSON, N.K. and MOSEMAN R.F.; A New Metabolite of Chlorpyrifos: Isolation and Identification. *J. Agric. Food Chem.*, **1978**; 26, pp. 1.

MACARENA, M.M., ARAVENA, P.A.A., ANDONAEGUI, M.T.; Validación de la metodología analítica para la cuantificación de sodio y potasio por fotometría de llama, en soluciones parenterales de gran volumen, Santiago, Chile: Laboratorio B.BRAUN MEDICAL, **2004**, pp. 23-26.

MATOLCSY, G., NÁDASY, M. and ANDRISCA, V.; Studies in environmental science 32 pesticide chemistry, Amsterdam: Elsevier science publishers, **1988**; pp. 389- 395.

MINAMIDA, I., IWANAGA, K., TABUCHI, T., AOKI, I., FUSAKA, T., ISHIZUKA, H. and OKAUCHI, T.; Synthesis and insecticidal activity of acyclic nitroethene compounds containing a heteroaryl amino group. *J Pestic. Sci.*, **1993**; 18, pp. 41-48.

MORENO, M.J.; VILORIA, A.; LÓPEZ, E.; BELÉN, D.; Estabilidad de antocianinas en jugos pasteurizados de mora (*Rubus glaucus* Benth), *Arch. Lat. Nutr.*, **2002**, 52, pp.181-186.

MULLA, M.S., NORLAND, R.L. and FANUVA. D.M.; Control of chironomid midges in recreational lakes. *J. Econ. Entomol.*, **1971**; 64 pp. 300-307.

NOLLET, L.M.L.; Food analysis by HPLC. New York: 2^o Edition, Marcel Dekker, Inc., **2000**, pp. 805-846.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. Association of official analytical chemists AOAC 990.16. 18th Edition, Inc. Washington, D.C. **2005**.

Pesticide residues in food – Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Tebuconazole (188), **1994**; pp. 1055-1098.

PETERSON, C.A. and EDGINGTON, L.V.; Transport of benomyl into various plant organs. *Phytopathology*, **1971**; 61, pp. 91-92.

PLIMMER, J.R.; Handbook of pesticide toxicology: Chemistry of pesticides. New York: Academic Press Inc, **2002**; pp. 95-107.

QUATTROCHI, O.A., ANDRIZZI, S.A., LABA, R.F.; Introducción a la HPLC aplicación y práctica. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro S.A, **1992**, pp. 89-137.

RAJ, P.S. and MIKIO, C.; Solubility of Benomyl in Water at Different pHs and Its Conversion to Methyl 2-Benzimidazolecarbamate, 3-Butyl-2,4-dioxo[1,2-a 1-s -triazinobenzimidazole, and 1-(2-Benzimidazolyl)-3-n -butylurea. *J.*

Agric. Food Chem., **1985**; 33, pp.63-67.

RICHARDSON, M.L. and GANGOLLI, S.; The Dictionary of Substances and their Effects. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, **1997**. Versión digital en <http://www.knovel.com>.

RISSATO, S.R., MAÑÁ, R.S., APON, B.M. and ARRUDA, S.P.; Multiresidue Analysis of Pesticides in Soil by Supercritical Fluid Extraction/Gas Chromatography with Electron-Capture Detection and Confirmation by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, pp. 62-69.

RÖDEL, W., WÖLM, G.; A guide to gas chromatography. Berlín: VEB Deutscher, Verlag der Wissenschaften, **1987**, pp. 15-17.

SCHEUFLER, H.; Effects of relatively high doses of dimethoate and trichlorfon on the embryogenesis of laboratory mice. *Biol. Rundsch.*, **1975**; 13, pp. 238-240.

SCHEUFLER, H.; Experimental testing of chemical agents for embryo toxicity, teratogenicity and mutagenicity - ontogenic reactions of the laboratory mouse to these injections and their evaluation - a critical analysis method. *Biol. Rundsch.*, **1976**, 14, pp. 227-229.

SCHIMMEL, S.C., GARNES, R.L., PATRICK J.M. and MOORE, J.C.; Acute toxicity, bioconcentration, and persistence of AC 222, 705, benthocarb, chlorpyrifos, fenvalerate, methyl parathion, and permethrin in the estuarine environment. *J. Agric. Food Chem.*, **1983**; 31, pp. 104-113.

SETTLE, F.A.; Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. New Jersey: Prentice, Hall, Inc., **1997**, pp. 994.

SKOOG, D.A., HOLLER, F.J. and NIEMAN, T.A.; Principios de análisis instrumental. Barcelona: 5^{ta} Edición, McGraw-Hill, **2001**, pp. 382-431, 729-828.

SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J. and GIAJCH, J.L.; Practical HPLC method development. New York: 2^o Edition, Wiley, **1997**, pp. 21-125.

SPINAK, E. Diccionario Enciclopédico de Bibliometría, Cienciometría e Informetría, Caracas: UNESCO, 1996, pp. 34 -131. HORWITZ, W.; Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. *Anal. Chem.*, **1982**, 54, p.p.67.

SZALKOWSKI, M.H. and STALLARD, D.E.; Effect of pH on the hydrolysis of chlorothalonil. *J. Agric. Food Chem.* **1977**; 25, pp. 208- 210.

TAYLOR, J.K.; Validation of Analytical Methods. *Anal. Chem.*, **1983**, 55, pp. 600-608.

TIŠLER, T.; JEMEC A.; MOZETIC B.; TREBŠE P.; Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere*, **2009**, 76, pp.907–914.

TOPUZ S.; Simultaneous determination of various pesticides in fruit juices by HPLC-DAD. *Food Control.*, **2005**; 16, pp. 87–92.

TURNER, N.J., LINPEL, L.E., BATTERSHELL, R.D., BLUESTONE, H. and

LARNONT, D.; A new foliage protectant fungicide, tetrachloroisophthalonitrile. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **1964**; 22, pp. 303-310.

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). Ambient Water Quality Criteria for Chlorpyrifos., **1986**; U.S. Environ. Protection Agen. Rep. 440/5-86-005. 64 p.

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). Preliminary Quantitative Use Analysis. **1982**; U.S. Environ. Protection Agen., Economics Analysis Branch, 401 M St. S.W., Washington D.C., 20460. 10 p.

VENEZIANO, A.; Determination of carbendazim, thiabendazole and thiophanate-methyl in banana (*Musa acuminata*) samples imported to Italy. *Food Chem.*, **2004**; 87, pp. 383–386.

VERONIKA, M.R.; Pitfalls and errors of HPLC in pictures. Weinheim: 2^o Edition, Edited by Wolfgang Dünges, **1997**, pp. 100-105.

VINCENT P.G. and SISLER H.D.; Mechanism of antifungal action of 2,4,5,6 tetrachloroisophthalonitrile. *Plant. Physiol.*, **1968**; 21, pp. 1249-1264.

WOODROW, J.E. and SEIBER, J.N.; Analytical Method for the Dithiocarbamate Fungicides Ziram and Mancozeb in Air: Preliminary Field Results. *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43, pp. 1524-1529.

XU, G. and **ZHENG, W.**; Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a newly isolated *Paracoccus* sp. Strain TRP. *Int. Biodeter. Biodegr.*, **2008**; 62 pp.51–56.

YOUNG, W.L. and NEIL, D.W.; Gas Chromatographic Quantitative Analysis and Persistence of Dimethoate and Dimethoxon Residues on and in Wheat Plants. *J. Agric. Food Chem.*, **1981**; 29, pp.4.

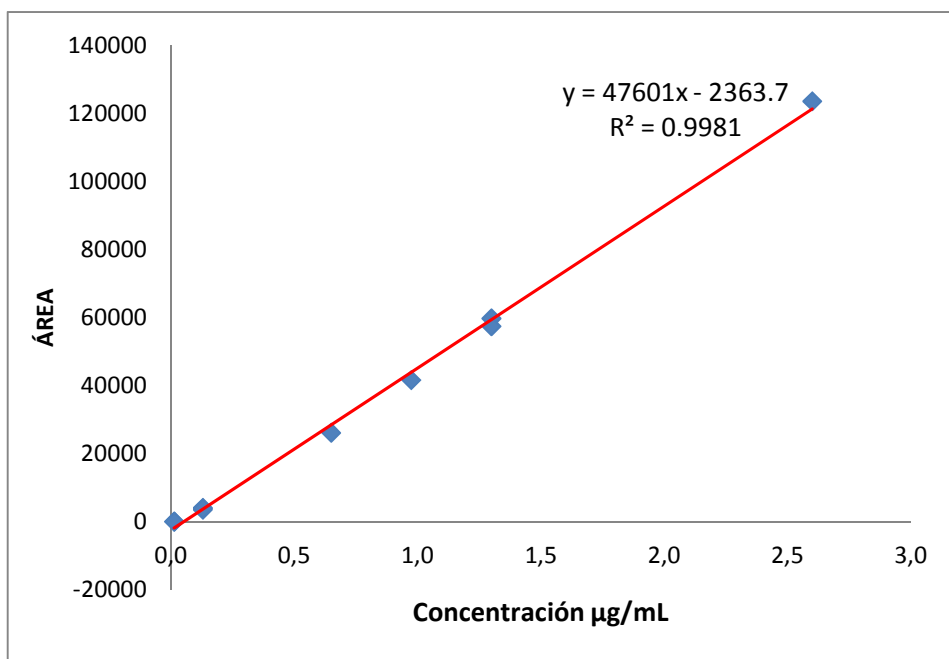
ZHAO, Q., DOURSON, M. and GADAGBUI, B.; A review of the reference dose for chlorpyrifos. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **2006**; 44, pp .111-24.

ZHUBO D.; *Simultaneous Analysis of Hexaconazole, Myclobutanil, and Tebuconazole Residues in Apples and Soil by SPE Clean-Up and GC with Nitrogen–Phosphorus Detection*, , *Chromatographia*, **2010**; 71, pp.7-8.

ANEXOS

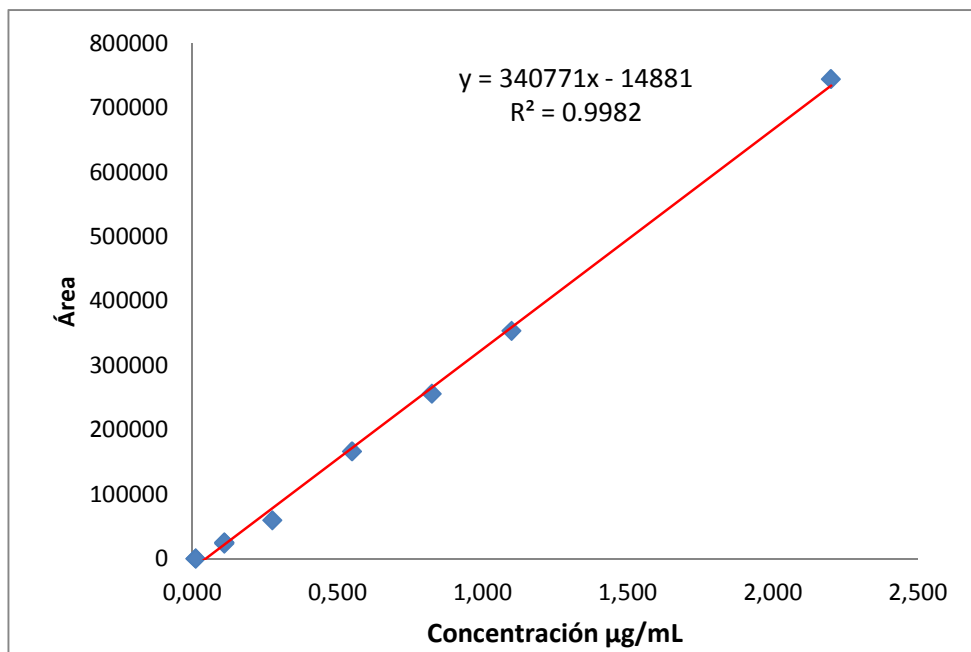
Anexo A. Curvas de calibración de dimetoato, clorotalonil, clorpirifos, tebuconazol, imidacloprid, carbendazim, benomil, mancozeb y propineb.

DIMETOATO



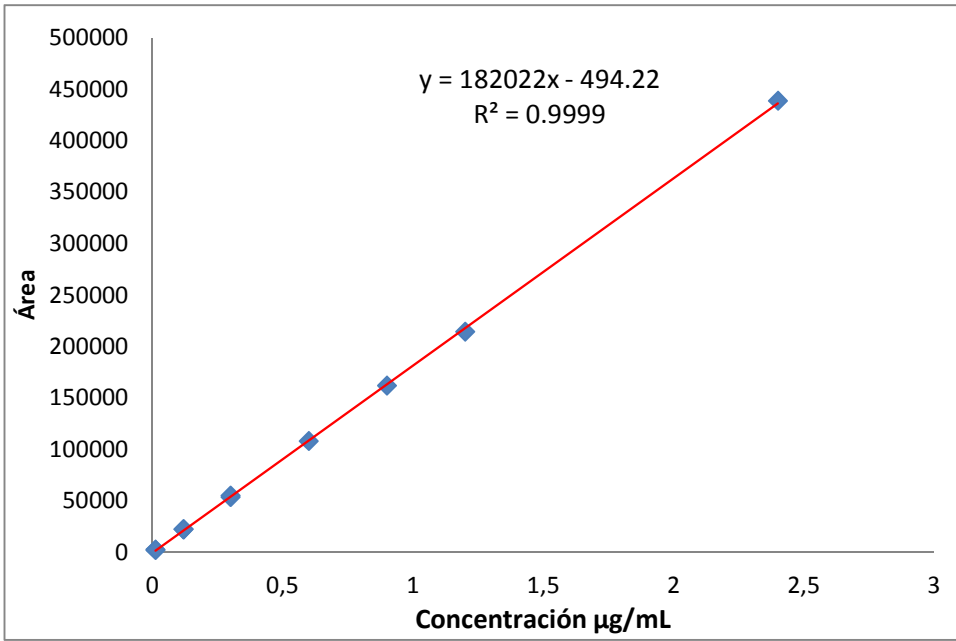
Concentración µg/mL	Área
0,01	146,6
0,01	152,1
0,1	3655,3
0,1	4156,2
0,1	3990,5
0,7	26200,0
1,0	41694,3
1,3	59840,6
1,3	57535,4
2,6	123668,0

CLOROTALONIL



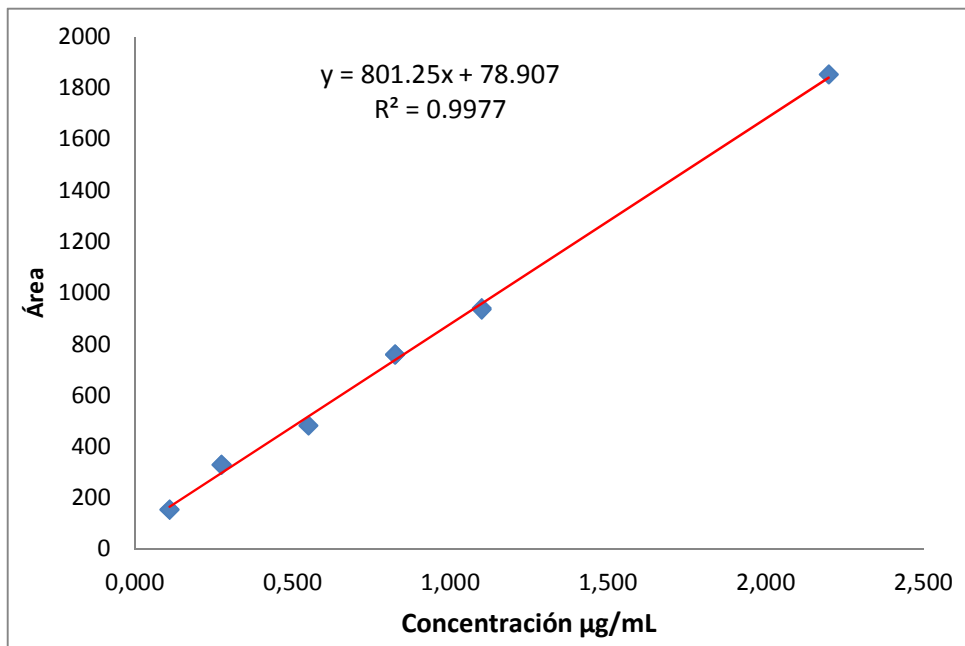
Concentración µg/mL	Área
0.011	500
0.011	421
0.110	23714
0.110	25406
0.110	25608
0.275	60100
0.550	167000
0.825	256425
1.100	354066
2.200	744718

CLORPIRIFOS



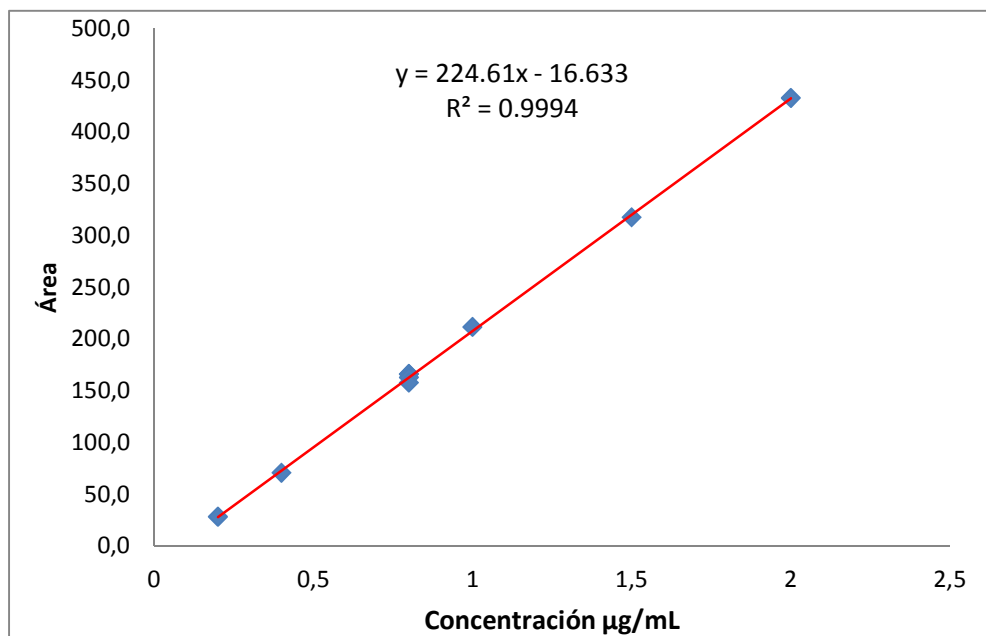
Concentración µg/mL	Área
0,012	2243
0,012	2295
0,120	22301
0,120	22323
0,300	53605
0,300	54900
0,600	108000
0,900	161814
1,200	214443
2,400	438712

TEBUCONAZOL



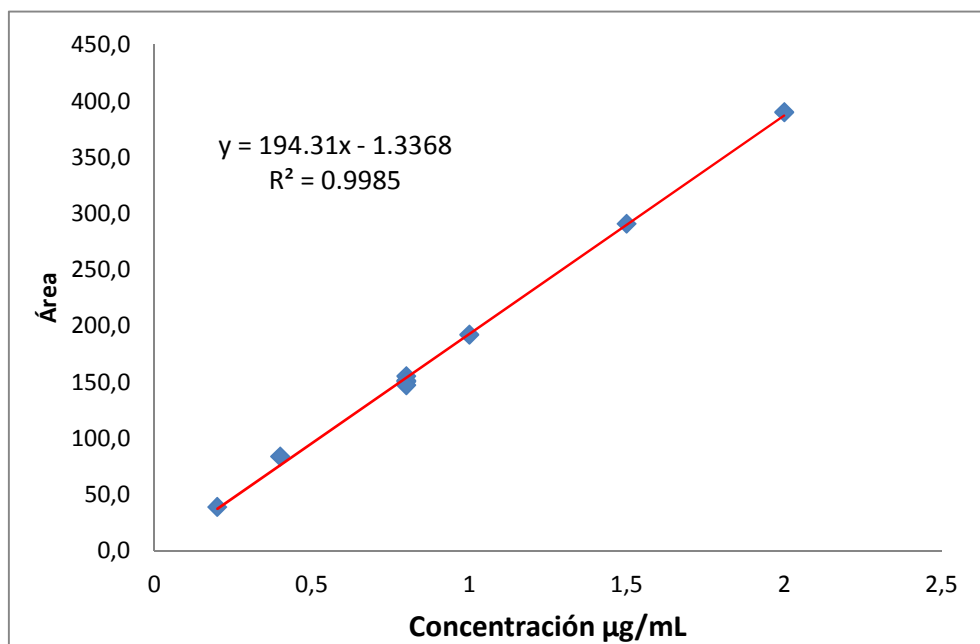
Concentración µg/mL	Área
0,110	153
0,110	155
0,275	328
0,275	330
0,550	482
0,825	759
0,825	759
1,100	941
1,100	934
2,200	1853

IMIDACLOPRID



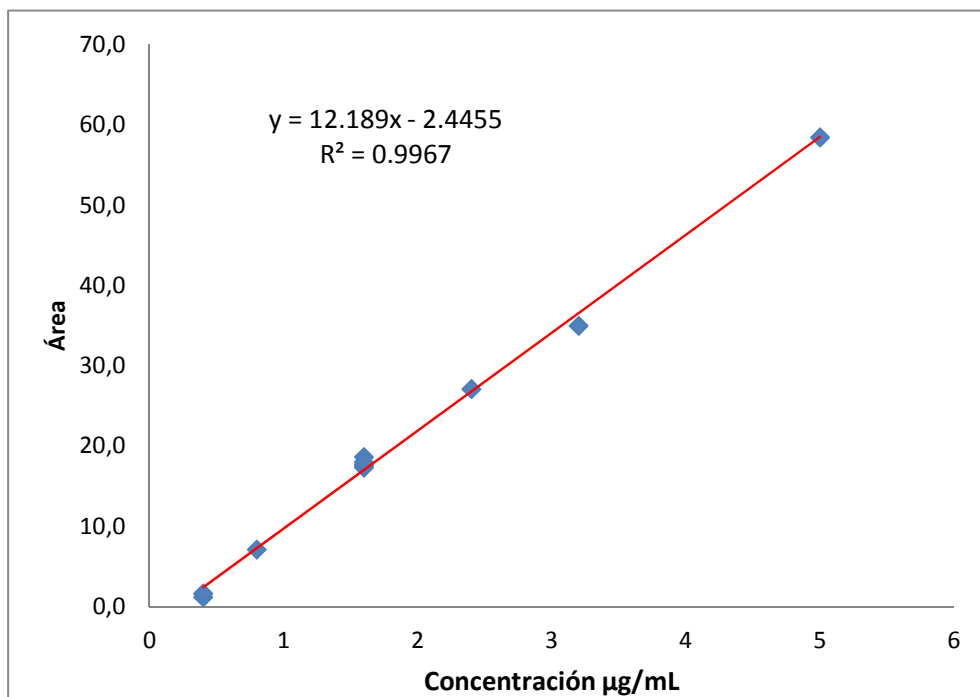
Concentración µg/mL	Área
0,2	28,4
0,4	70,9
0,8	166,3
0,8	166,1
0,8	162,9
0,8	157,9
1,0	211,7
1,5	317,6
2,0	432,8

CARBENDAZIM



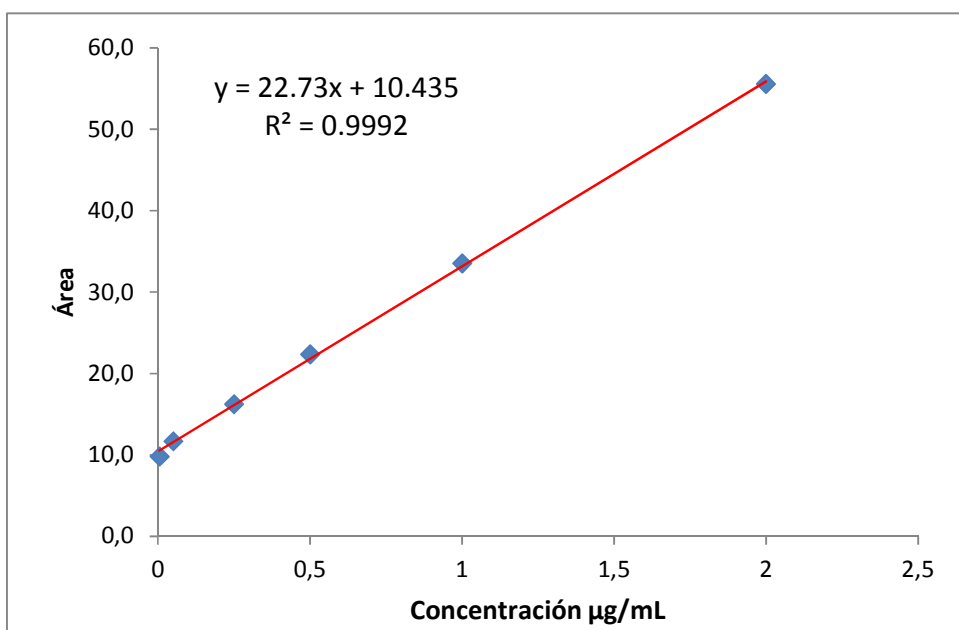
Concentración µg/mL	Área
0,2	38,9
0,4	83,7
0,8	155,3
0,8	151,5
0,8	150,7
0,8	147,4
1,0	192,3
1,5	290,9
2,0	390,1

BENOMIL



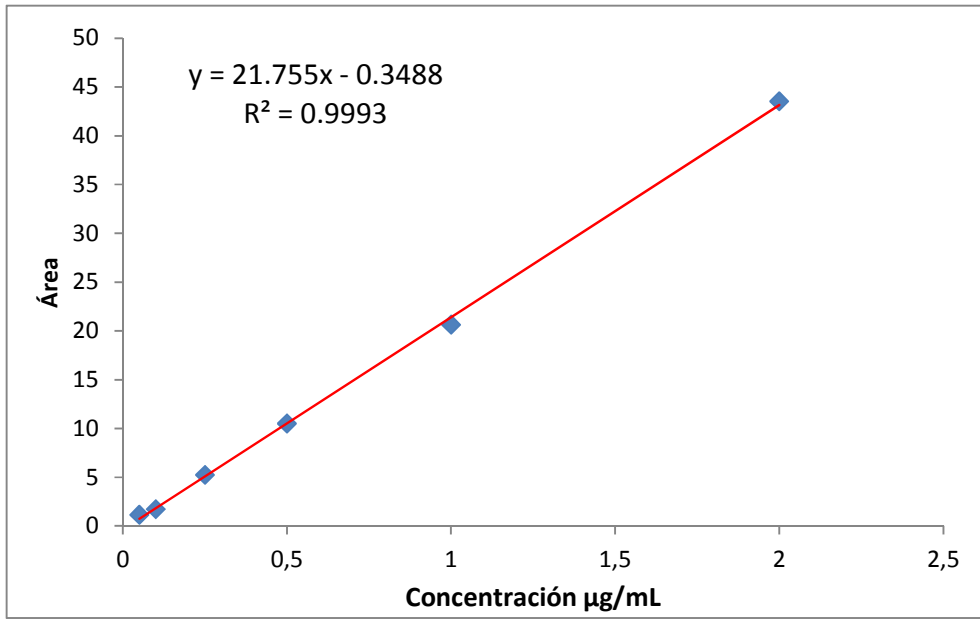
Concentración µg/mL	Área
0,4	1,2
0,4	1,6
0,8	7,1
1,6	18,6
1,6	17,3
1,6	17,6
1,6	17,4
1,6	18,0
2,4	27,1
3,2	35,0
5,0	58,4

MANCOZEB



Concentración µg/mL	Área
0,005	9,8
0,05	11,7
0,25	16,2
0,5	22,4
1,0	33,5
2,0	55,6

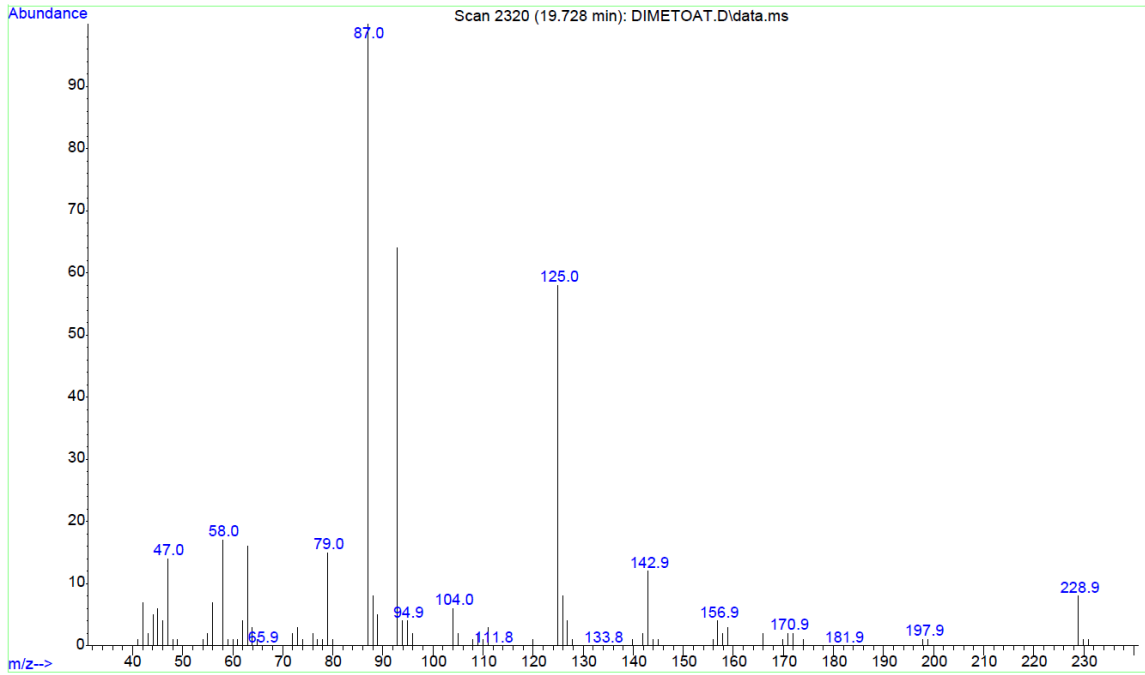
PROPINEB



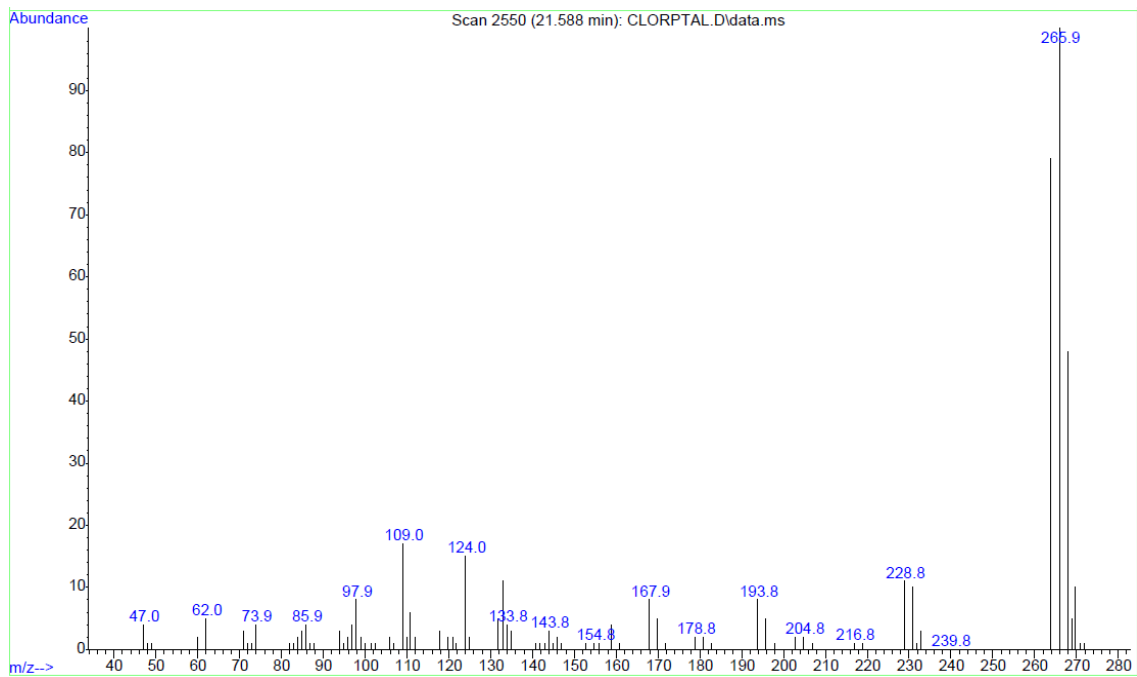
Concentración µg/mL	Área
0,05	1,1
0,10	1,7
0,25	5,2
0,5	10,5
1,0	20,6
2,0	43,5

Anexo B. Espectros de masas de dimetoato, clorotalonil, clorpirifos y tebuconazol, analizado en modo *full scan* entre 40-400 *m/z*

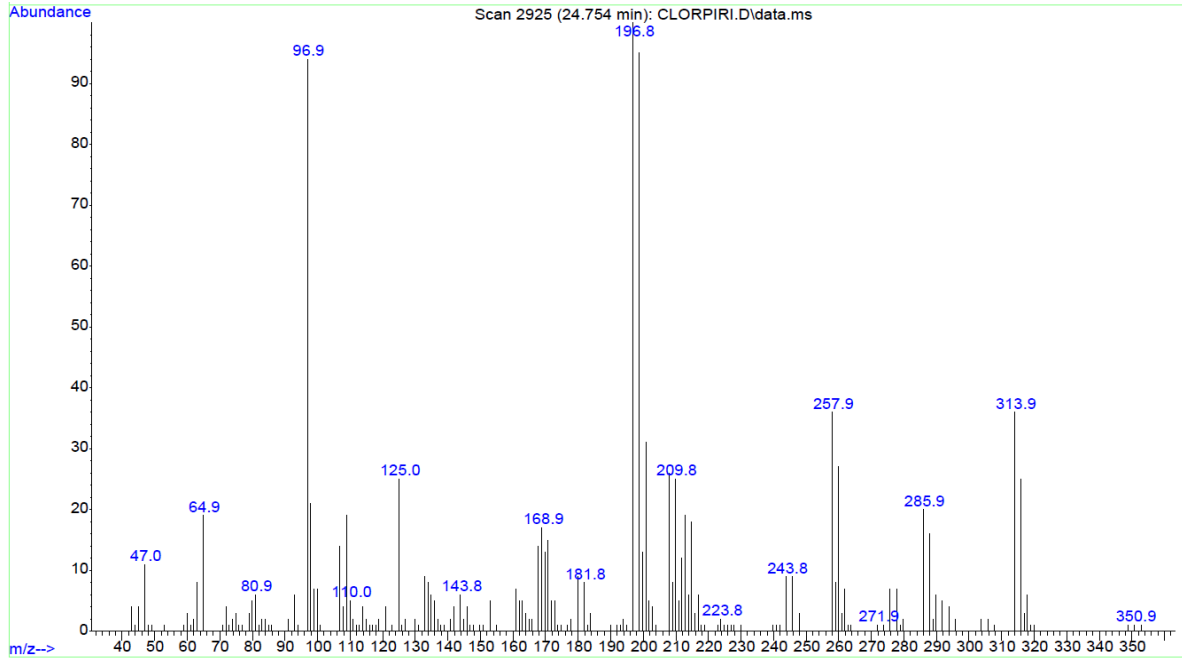
DIMETOATO



CLOROTALONIL



CLORPIRIFOS



TEBUCONAZOL

