

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO  
ESCUELA DE POST GRADO  
MAESTRÍA EN AGRICULTURA ANDINA**



**EVALUACIÓN DEL MÉTODO QUECHERS PARA  
CUANTIFICACIÓN DE AGROTOXICOS EN  
QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.)**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**FRANZ ZIRENA VILCA**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:  
MAGÍSTER SCIENTIAE EN AGRICULTURA ANDINA  
CON MENCIÓN EN AGROECOLOGÍA**



**PUNO - PERÚ**

**2010**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO  
BIBLIOTECA CENTRAL  
Fecha Ingreso 02 OCT. 2012  
N° 00206

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO-PUNO

ESCUELA DE POST GRADO

MAESTRÍA EN AGRICULTURA ANDINA

EVALUACIÓN DEL MÉTODO QuEChERS PARA CUANTIFICACIÓN DE AGROTOXICOS  
EN QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.).

Tesis presentada por:

**FRANZ ZIRENA VILCA**

Para optar el Grado Académico de  
Magister Scientiae en Agricultura Andina  
Especialidad Agroecología

**TESIS APROBADA POR EL JURADO INTEGRADO POR:**

PRESIDENTE : \_\_\_\_\_

**Dr. Ángel Mujica Sánchez**

PRIMER MIEMBRO : \_\_\_\_\_

**Dr. Ernesto Chura Yupanqui**

SEGUNDO MIEMBRO : \_\_\_\_\_

**M.Sc. Walter Zamalloa Cuba**

DIRECTOR DE TESIS : \_\_\_\_\_

**M.Sc. Angel Cari Choquehuanca**

**PUNO - PERÚ**

**2010**

### **DEDICATÓRIA**

Con el mayor respeto y amor del mundo quiero dedicar este trabajo a los motores de mi vida y motivo de inspiración mis padres: Ernesto, Rosalinda y Judith Vilca (Q.P.D.D.G) a mi retoño mi gran adoración Samantha, mi linda tía Clorinda, para ustedes con el mayor respeto y amor.

“Comience haciendo lo que es necesario, después lo que es imposible y de repente usted estará haciendo lo imposible”. **San Francisco de Asís**

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por absolutamente todo lo que me ha dado, un gran padre "Ernesto", una linda abuelita "Rosa" una madre "Judith", mi gran amor mi hija "Samantha" y por haberme dado la oportunidad de existir en este mundo.

A la Escuela de Post Grado en Agricultura Andina de la Universidad Nacional del Altiplano y a los profesores que hacen parte de este centro superior de estudios por los conocimientos impartidos.

A la Universidad de São Paulo – Brasil, Centro de Energía Nuclear en la Agricultura, Laboratorio de Ecotoxicología, por las facilidades concedidas para la realización de este tan importante trabajo de investigación.

Al CNPq Brasil por el financiamiento de este trabajo.

Al excelentísimo Profesor Ph.D. Valdemar Luiz Tornisielo, por los sabios consejos, y orientación en el desarrollo de esta investigación.

Al Ing M.Sc. Aderbal Almeida Rocha, gran amigo mío y prácticamente mi hermano, por los días de arduo trabajo en el laboratorio luchando y aprendiendo a usar esos equipamientos tan sofisticados y por los momentos de jolgorio compartidos.

A Ph.D. Maria Aparecida Acosta, mi gran amiga casi mi segunda mamá en el Brasil, que con su agudo ojo crítico ayudó a llevar al frente este trabajo.

A mi gran amiga mi alma gemela Maria Eugenia, mujer y madre luchadora ejemplo de trabajo, por su amistad incondicional y estar siempre al pendiente de mi situación en el Brasil.

A los amigos del Laboratorio de Ecotoxicología del Centro de Energía Nuclear en la Agricultura: Dorelli, Carol, Rodrigo, Bruna, Joana, Priscilla, Rafael, Paulo, Graziela, Marcela, por su apoyo y compañía en mis días vividos en el Brasil.

Al Ing M.Sc. Angel Cari Choquehuanca, por su valioso apoyo en la dirección de este trabajo.

Al Ph.D. Angel Mujica Sanchez, por su valiosa ayuda en la colecta de muestras de quinua que fueron analizadas en este trabajo, sabios consejos y sobre todo sus observaciones de carácter científicas que con seguridad harán de este trabajo un buen documento de consulta para otros investigadores.

Al Dr. Ernesto Chura Yupanqui, por sus acertadas correcciones al presente trabajo, que con seguridad ayudaron bastante en elevar el nivel técnico del mismo.

Al M.Sc. Walter Zamalloa, por su paciencia, calma y sobre todo las críticas constructivas realizadas a este trabajo de investigación.

A mi gran amigo Giovani Eusebio Rojas, quien prácticamente fue mi embajador, mi mano derecha en el Perú, muchísimas gracias de todo corazón hermano.

A mi amigo Erick Espinoza, un gran amigo y compañero en el Brasil.

A todas las demás personas que de una u otra forma colaboraron en el desarrollo de este trabajo.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I.....	5
OBJETIVOS.....	6
CAPITULO II.....	7
MARCO TEÓRICO .....	7
2.1. Quinoa.....	7
2.1.1. Origen .....	7
2.1.2. Importancia económica .....	8
TABLA I. VALOR DE LA PRODUCCIÓN DE QUINUA EXPRESADO EN MILLONES DE SOLES A PRECIOS DE 1994.....	9
2.1.3. Importancia nutricional y composición.....	10
2.1.4. Producción mundial.....	12
2.1.5. Producción en el Perú.....	13
2.2. Agrotóxicos.....	13
2.2.1. Definición .....	14
2.2.2. Historia en el mundo .....	16
2.2.3. Clasificación.....	17
2.2.4. Toxicidad.....	18
2.2.5. Límites máximos de residuos (LMR).....	19
2.2.6. Uso de agrotóxicos en el cultivo de quinua. ....	21
2.3. Análisis de agrotóxicos en alimentos .....	21
2.3.1. Extracción de agrotóxicos .....	25
2.3.2. Método QuEChERS – extracción en fase sólida dispersiva (dSPE). ....	28
2.3.3. Análisis de agrotóxicos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.....	34
2.3.4. Efecto matriz.....	36
2.4. Validación del método analítico .....	40
2.4.1. Parámetros de validación.....	41
2.4.2. Selectividad.....	42
2.4.3. Linealidad y faja lineal de trabajo .....	43
2.4.5. Límite de detección y límite de cuantificación.....	45
2.4.6. Precisión .....	46

2.4.7. Exactitud .....	47
CAPITULO III .....	49
METODOLOGÍA .....	49
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	49
3.1. Muestras de quinua .....	49
3.2. Equipos .....	50
3.4. Fase sólida .....	50
3.5. Solventes y soluciones .....	50
3.6. Sales .....	51
3.7. Padrones analíticos .....	51
3.8. Otros materiales .....	52
3.9. Preparación de la muestra para análisis .....	52
3.8. Preparación de las soluciones analíticas .....	53
3.8.1. Soluciones de padrones de los agrotóxicos .....	53
3.8.2. Soluciones analíticas en el extracto .....	54
3.8.3. Soluciones analíticas en solvente .....	54
3.8.4. Fortificaciones de muestras de quinua .....	54
3.9. Análisis cromatográfico por LC MS-MS .....	55
3.9.1. Condiciones Cromatográficas .....	55
3.9.2. Análisis cualitativo y cuantitativo .....	55
3.10. Validación del método analítico .....	56
3.10.1. Determinación de la linealidad de las curvas analíticas .....	56
3.10.2. Determinación del LD y LC .....	56
3.10.3. Ensayos de extracción, fortificación y recuperación (%) .....	56
CAPITULO IV .....	59
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	59
4.1. Condiciones de análisis por LC MS-MS (modo MRM) .....	59
4.2. Validación del método analítico .....	61
4.2.1. Selectividad .....	61
4.2.2. Linealidad .....	63
Gráfico 14. Curva de calibración para el compuesto Monuron .....	69
4.2.3. Determinación de los valores de límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) .....	70

4.2.4. Precisión .....	72
4.3. Determinación de agrotóxicos en muestras de quinua.....	75
5. CONCLUSIONES .....	79
7. REFERENCIAS .....	81
GALERIA FOTOGRÁFICA.....	1
Foto 1. Preparo de la mesa para inicio de la extracción .....	1
Foto 2. Muestras de quinua listas para análisis.....	1
Foto 3. Material usado para La extracción.....	2
Foto 4. Cromatógrafo líquido acoplado a un tandén masa/masa (LC MS- MS) .....	2
Foto 5. Sala de cromatografía (CENA USP). .....	3
Foto 6. Pesando muestras de quinua para inicio de análisis .....	3
Foto 7. Reactivos usados en la investigación .....	4
Foto 8. Tubos de teflón de 50 mL conteniendo las muestras de quinua .....	4
Foto 9. Homogenizador (blender).....	5
Foto10. Primer clean up de la muestra.....	5
Foto 11. Etapa final del proceso de extracción acondicionamiento en el VIAL.....	6
Foto 12. Etapa final (filtrado de la muestra) .....	6

## LISTA DE TABLAS

Tabla I. Valor de la producción de quinua expresado en millones de soles a precios de 1994.....	22
Tabla II. Contenido de macro nutrientes de quinua, amaranto, trigo sarraceno y semillas de trigo.....	24
Tabla III Comparativo de contenido de Zinc.....	25
Tabla IV. Clases toxicológicas de los agrotóxicos y sus respectivos colores en las etiquetas de las formulaciones.....	32
Tabla V- Publicaciones recientes de análisis de multiresíduos utilizando el método QuEChERS en diferentes matrices.....	44
Tabla VI. lista de padrones analíticos .....	62
Tabla VII. Características de Ions monitoreados en el espectrómetro de masas .....	70
Tabla VIII. Prueba significativa de (t) 95% para evaluar efecto matriz.....	72
Tabla IX Respuestas cromatográficas en solvente.....	73
Tabla X cálculo del límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).....	81

Tabla XI. Porcentaje de recuperación .....	83
Tabla XII. Resultados de contenido de los agrotóxicos (herbicidas y de acción múltiple) en muestras de quinua expresados en $\mu\text{g kg}^{-1}$ .....	85
Tabla XIII. Resultados de contenido de los agrotóxicos (fungicidas y de insecticidas) en muestras de quinua expresados en $\mu\text{g kg}^{-1}$ .....	86

## LISTA DE GRAFICOS

Grafico 1. Curva de calibración del compuesto Azoxistrobin.....	74
Grafico 2. Curva de calibración del compuesto Difeconazole.....	75
Grafico 3. Curva de calibración del compuesto Metamidofos.....	75
Grafico 4. Curva de calibración del compuesto Malation.....	75
Grafico 5. Curva de calibración del compuesto Imidaclopride.....	76
Grafico 6. Curva de calibración del compuesto Acefate.....	76
Grafico 7. Curva de calibración del compuesto Metolacloro.....	76
Grafico 8. Curva de calibración del compuesto Monocrotofos.....	77
Grafico 9. Curva de calibración del compuesto Atrazina.....	77
Grafico 10. Curva de calibración del compuesto Carbofurano.....	77
Grafico 11. Curva de calibración para el compuesto Triazofos.....	78
Grafico 12. Curva de calibración para el compuesto Buprofezin.....	78
Grafico 13. Curva de calibración para el compuesto Ciproconazol.....	78
Gráfico 14. Curva de calibración para el compuesto Monuron.....	79
Gráfico 15. Curva de calibración para el compuesto Tiametoxan.....	79
Grafico 16. Curva de calibración para el compuesto Metribuzin .....	79
Grafico 17. Curva de calibración para el compuesto Clorpirifos.....	80

## RESUMEN

El presente trabajo fue realizado en los laboratorios de la Universidad de São Paulo, Centro de Energía Nuclear en la Agricultura, laboratorio de Ecotoxicología Brasil, en el periodo comprendido entre diciembre del 2009 a junio del 2010, los objetivos fueron: a).evaluación y establecimiento de la metodología para análisis multiresíduos QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) para la cuantificación de residuos de agrotóxicos en quinua. b). cuantificar residuos de agrotóxicos contenidos en 24 muestras procedentes de diferentes zonas productoras del departamento de Puno. c).incentivar e facilitar la investigación de multiresíduos en esta matriz; se estudió 24 muestras de quinua de producción convencional colectadas en el departamento de Puno-Peru y una muestra de quinua orgánica obtenida en el Brasil, fue evaluada la aplicabilidad del método QuEChERS para la identificación y cuantificación de agrotóxicos en granos de quinua. Fueron monitoreados los agrotóxicos: Metamidofos, Acefate, Monocrotofos, Tiametoxan, Imadoclopride, Atrazina, Azoxystrobin, Buprofezina, Carbofurano, Ciproconazol, Malation, Deltametrina, Difeconazole, Metribuzin, Monuron, Triazofos, Clorpirifos, Metolacloro. Los parámetros de validación fueron: linealidad, sensibilidad, límite de detección y cuantificación, efecto matriz, porcentaje de recuperación. La prueba estadística utilizada para la validación del método analítico fue: prueba de significancia de "t" student a una probabilidad de 95%, Fue utilizada una columna C18 y gradiente de acetonitrila y agua como fase móvil; se elaboraron curvas de calibración utilizando patrones analíticos para cada compuesto. Los coeficientes de correlación de las curvas de calibración fueron satisfactorios ( $R^2 > 0,99$ ), los límites de detección están entre 0,005 a 0.0420  $\mu\text{g kg}^{-1}$

<sup>1</sup> y el de cuantificación entre 0,014 a 1,274  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Los agrotóxicos Metamidophos, Carbofurano y Atrazina mostraron bajas tasas de recuperación, la matriz estudiada no mostró suficiente diferencia estadística significativa que evidencie la interferencia durante la caracterización y cuantificación de los agrotóxicos monitoreados por el método; todas las muestras analizadas contenían residuos de por lo menos 5 agrotóxicos, los resultados más relevantes quedaron por cuenta del Acefato, que presentó residuos entre 5,605 y 10,140  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , Azosxytrobín con valores entre 6,711 y 11,020  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , Malation entre 5,605 y 10,140  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , Metolacoloro con valores entre 7,403 y 8,042  $\mu\text{g kg}^{-1}$  y Triazofos que contenía residuos entre 8,466 y 9,325  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . No existe registro de ningún agrotóxico en la legislación peruana y ni en el Codex Alimentarius para esta matriz, lo que impide establecer una correlación de estos resultados. Concluyéndose que el método de extracción QuEChERS se muestra adecuado y eficiente para la realización de análisis y la cuantificación por LC-MS/MS fue altamente sensible.

Palabras claves: Triplocuadrupolo, validación, método analítico, toxicidad y residuos.

## ABSTRACT

This work was carried out at the laboratories of the São Paulo University, Center for Nuclear Energy in Agriculture, Ecotoxicology Laboratory of Brazil during the period December 2009 to June 2010, the objectives were: a). Assessment and establishing the methodology for multiresíduos analysis QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) for the quantification of agrochemicals residues in quinoa. b) Quantify pesticide residues content in 24 samples from different growing areas of the Puno department c). Encourage and facilitate multiresíduos researches in this matrix; was studied 24 samples collected from conventional quinoa production in the department of Puno, Peru and a sample of organic quinoa obtained in Brazil; was evaluated the QuEChERS method applicability for identification and quantification of agrochemicals in grains of quinoa. Agrochemicals were monitored: Metamidophos, Acefate, Monocrotophos, Tiametoxan, Imadoclopride, Atrazina, Azoxystrobin, Buprofezin, Carbofurano, Ciproconazol, Malation, Deltametrin, Difeconazole, Metribuzin, Monuron, Triazofos, Clorpirifos, Metolacoloro. Validation parameters were: linearity, sensitivity, limit of detection and quantification, matrix effect, recovery rate. The statistical test used for validation of analytical method was: a test of significance of "t" student to 95%, a C18 column and gradient of acetonitrile and water as mobile phase was used; calibration curves were prepared using analytical standards for each compound. The correlation coefficients of calibration curves were satisfactory ( $R^2 > 0.99$ ) the detection limits are between 0.005 to 0.0420 mg kg<sup>-1</sup> and the quantification between 0.014 to 1.274 mg kg<sup>-1</sup>. The agrochemicals Metamidophos, Carbofuran, and Atrazine showed low recovery rates, the matrix studied showed no enough

difference statistically significant that evidences the interference during the characterization and quantification of pesticides monitored by the method, all samples contained residues of at least 5 agrochemicals, the most relevant results were on account of Acephate, which had traces between 5.605 and 10.140 mg kg<sup>-1</sup>, Azoxystrobin with values between 6.711 and 11.020 mg kg<sup>-1</sup>, Malathion between 5.605 and 10.140 mg kg<sup>-1</sup>; with values between Metholachlor 7.403 and 8.042 mg kg<sup>-1</sup> and Triazophos waste containing between 8.466 and 9.325 mg kg<sup>-1</sup>. There is no record of any pesticides in Peruvian legislation or in the Codex Alimentarius for this matrix, which prevents any correlation of these results. Concluding that the extraction method QuEChERS it's showed adequate and efficient for analysis and quantification by LC-MS/MS was highly sensitive.

Keywords: Triploquadropol, validation, analytical method, toxicity and residues

## INTRODUCCIÓN

El crecimiento demográfico mundial y la consiguiente necesidad de aumento de la productividad en el sector agrícola han llevado a un mayor uso de plaguicidas en la producción de alimentos, con consecuencias para la salud, el impacto en los seres humanos y al medio ambiente no son conocidos completamente (Araujo et al., 2000 y Tadeo, J.L. 2008).

La velocidad de su acción, facilidad de uso, economía y eficiencia de los productos químicos, aparentemente constituía la solución de muchos los problemas agrícolas, de modo que hubo un aumento sustancial de producción y consumo de plaguicidas en las últimas décadas. Sin embargo, el uso de grandes cantidades, a menudo de manera inapropiada, puede eventualmente traer problemas a la salud pública, con un gran número de envenenamientos (Pessini, 2003).

En el departamento de Puno se cultiva la mayor parte de la quinua que se produce en el país y se concentra en los terrenos comunales, bajo el "sistema de aynocas", en estos campos es posible encontrar una gran diversidad de ecotipos y variedades de quinua que los campesinos pueden reconocer y que las cultivan en mezclas como una forma de disminuir el riesgo del ataque de enfermedades, plagas y daños por factores climáticos. (Mujica et al., 2001).

Al tratar de eliminar este problema, los ecologistas asumieron la defensa de la agricultura sin el uso de plaguicidas. Sin embargo, se sabe que los cultivos libres de pesticidas generan cosechas con menores rendimientos lo que conduce

a mayores áreas de cultivos para obtenerse la misma cantidad de alimentos, colocando en riesgo nuevos ecosistemas. Por eso los agrotóxicos sintéticos continúan siendo las alternativas más eficaces en el control de plagas (Pinho, 2007).

El análisis de residuos de agrotóxicos desempeña un papel indispensable en la estimación de la exposición de los seres humanos, el medio ambiente a estos productos y el control del cumplimiento de los agricultores sobre las buenas prácticas agrícolas, con una visión para facilitar las decisiones de regulación, comercial y fortalecer la confianza del consumidor en la seguridad alimentaria. Para suprimir estas necesidades, fabricantes de instrumentos y analistas de residuos en todo el mundo están en constante desarrollo y aplicación de nuevas técnicas de análisis y enfoques con el objetivo de simplificar y acelerar los procedimientos, mejorar la calidad del análisis, de reducir el consumo de reactivos y el trabajo analítico (Anastassiades y Scherbaum, 2005).

Desde que la presencia de residuos de agrotóxicos en los productos agrícolas, se ha vuelto evidente y como consecuencia de los riesgos potenciales que representan para la salud humana, varias leyes para proteger la salud pública fueron adoptadas en muchos países. Este interés, que no es sólo de los gobiernos, también se refleja en la opinión pública, llevó a la intensificación de acciones para garantizar la seguridad de suministro de los alimentos y para proteger a los seres humanos de los residuos nocivos. En este contexto, la química analítica tiene una posición clave, ya que desempeña un papel importante en varias áreas: la definición de "niveles seguros", así como proporcionar

información adicional para el establecimiento de los mecanismos básicos de la toxicidad, ubicación de estos compuestos en la cadena alimentaria, proporcionar apoyo para el establecimiento de los niveles de los reglamentos o límites máximos de residuos (LMR), y la determinación de la presencia de residuos de agrotóxicos y/o sus metabolitos en el abastecimiento de alimentos (Agüera y Kok, 2005).

Tradicionalmente la cromatografía a gas (CG) es una técnica analítica escogida para análisis de residuos en alimentos y avances en esta área han sido estrechamente asociados a la evolución de la técnica. El acoplamiento con la espectrometría de masas (EM) se tornó viable con la introducción de la columna capilar. La introducción de detectores ion-trap, en el final de 1980, represento una mejora importante en los análisis de residuos de agrotóxicos, consecuencia de su excelente sensibilidad en niveles de picogramas (Agüera y Kok, 2005).

En la actualidad la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC o CLAE) es una de las principales técnicas utilizadas en los análisis de compuestos no volátiles y/o térmicamente inestables. A pesar de ser una excelente técnica de separación, la HPLC necesita de una técnica confirmatoria en relación al análisis cualitativo (confirmación de la identidad química) es también necesario, dentro de las varias opciones existentes en este momento, la espectrometría de masas es la técnica que proporciona mejor las informaciones estructurales necesarias; el acoplamiento entre estas dos técnicas da origen a una herramienta analítica versátil y de grande potencial en el análisis cualitativo y cuantitativo de los compuestos químicos (Lanças, 2009).

Visto que la utilización de agrotóxicos para el control de enfermedades y plagas en el cultivo de quinua no está exenta, el monitoramiento detallado y eficiente de los residuos en este cultivo, es de fundamental importancia, principalmente para asegurar la calidad de los alimentos que llegan a la mesa del consumidor. Para eso se hace necesario un estudio en el cual sean efectuados análisis multiresíduos de agrotóxicos con una metodología analítica que pueda alcanzar resultados de alta calidad simultáneamente para una amplia variedad de agrotóxicos.

## **CAPÍTULO I**

### **PROBLEMÁTICA DE LA INVESTIGACIÓN.**

Los daños causados a la salud de los agricultores y el ambiente debido al uso indiscriminado de agrotóxicos han aumentado en los últimos años. El uso intensivo y generalizado de estas sustancias ha creado varios problemas relacionados con la salud pública y el desequilibrio del ambiente, incluyendo el envenenamiento de los agricultores, la contaminación de los alimentos y el ambiente. La quinua es un grano andino de alto valor nutritivo, de suma importancia en la dieta de los pobladores andinos, que en la actualidad viene siendo exportado a mercados internacionales, su cultivo requiere de la aplicación de pesticidas para así llegar a un resultado satisfactorio que requiere disciplina en la aplicación de los mismos. A pesar de la preocupación por el control de residuos de pesticidas en los alimentos, algunos métodos de análisis pueden lograr resultados de alta calidad para una amplia gama de pesticidas. Así los objetivos de este trabajo son:

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Validar el método analítico QuEChERS para la realización de análisis multiresíduos de agrotóxicos en quinua.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluación y establecimiento de la metodología para análisis multiresíduos QuEChERS para la cuantificación de residuos de agrotóxicos en quinua.
- Cuantificar residuos de pesticidas contenidos en 24 muestras procedentes de diferentes zonas productoras del departamento de Puno.
- Incentivar e facilitar la investigación de multiresíduos en esta matriz.

## **CAPITULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. Quinoa**

“La quinoa, es una planta herbácea anual, de amplia dispersión geográfica, presenta características peculiares en su morfología, coloración y comportamiento en diferentes zonas agroecológicas donde se la cultiva, fue utilizada como alimento desde tiempos inmemoriales, se calcula que su domesticación ocurrió hace más de 7000 años Antes de Cristo, presenta enorme variación y plasticidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales, se cultiva desde el nivel del mar hasta los 4000 m.s.n.m., desde zonas áridas, hasta zonas húmedas y tropicales, desde zonas frías hasta templadas y cálidas; muy tolerante a los factores abióticos adversos como son sequía, helada, salinidad de suelos y otros que afectan a las plantas cultivadas”. (Mujica et al., 2001).

##### **2.1.1. Origen**

“La zona andina comprende uno de los ocho mayores centros de domesticación de plantas cultivadas del mundo, dando origen a uno de los sistemas agrícolas más sostenibles y con mayor diversidad genética en el mundo.

La quinua, una planta andina, muestra la mayor distribución de formas, diversidad de genotipos y de progenitores silvestres, en los alrededores del lago Titicaca de Perú y Bolivia, encontrándose la mayor diversidad entre Potosí - Bolivia y Sicuani (Cusco) – Perú. Existen pocas evidencias arqueológicas, lingüísticas, etnográficas e históricas sobre la quinua. Sin embargo, existen evidencias claras de la distribución de los parientes silvestres, botánicas y citogenéticas, lo que posiblemente demuestra que su domesticación tomó mucho tiempo, hasta conseguir la planta domesticada y cultivada a partir de la silvestre, proceso que probablemente se inició como planta usada principalmente por sus hojas en la alimentación y luego por las semillas. Actualmente, las especies y parientes silvestres se utilizan localmente como jataco o llipcha (verdura de hoja) en muchas comunidades del área andina. Posteriormente, la especie fue adaptada a diferentes condiciones agroclimáticas, edáficas y culturales, haciendo que la planta presente una amplia adaptación desde el nivel del mar hasta los 4000 msnm y usos diversos en las diferentes comunidades étnicas de acuerdo a sus necesidades alimentarias” (Mujica et al., 2001).

### **2.1.2. Importancia económica**

La quinua es un grano nutritivo que se cultiva en las tierras alto andinas. Este cultivo fue utilizado por las culturas precolombinas de América del Sur durante siglos. Eran muy importantes para los incas, junto con el maíz y las papas. Esta planta es resistente al frío y tolerantes a la sequía y puede ser cultivada en montañas altas, hasta los 4000 msnm. La variabilidad genética de la quinua es enorme, con cultivares que se adaptan al nivel del mar hasta las altas montañas,

de climas fríos de las tierras altas a las condiciones subtropicales. La quinua es usualmente referida como un pseudocereal, desde que no es miembro de la familia de las gramíneas, pero producen semillas que pueden ser molidos en harina y se usa como un cereal. La quinua Se utiliza principalmente en sopas y también en lugar de arroz. Este grano es libre de gluten y puede ser utilizado por las personas que sufren de la enfermedad celíaca. También se utilizan en alimentos infantiles. (Mujica et al., 2001 y Jubete et al. 2009).

Debido a estas características principalmente nutritivas, es que la importancia económica de la quinua cobra realce en la agricultura andina. En la tabla I son presentados algunos datos sobre el valor de la producción de quinua hasta el año 2007.

**TABLA I. VALOR DE LA PRODUCCIÓN DE QUINUA EXPRESADO EN MILLONES DE SOLES A PRECIOS DE 1994.**

AÑOS							
2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
19,220	15,181	20,708	20,512	18,406	22,219	20,745	21,675

Fuente: Ministerio de Agricultura del Perú (2007)

En los últimos años se aprecia una grande demanda de este producto por mercados internacionales. Según el Ministerio de Agricultura del Perú (2007). Durante el año 2006, el Perú exportó 1277.1 toneladas de quinua y para el año de 2007 esta cantidad se incrementó en un 23.4%, haciendo un total de 1575.7 toneladas de quinua exportadas. Exportaciones que generaron 1548.1 millones

de dólares para el año 2006 y 2035.0 millones para el 2007 respectivamente. Para éste año 2010, el Brasil puede convertirse en uno de los principales compradores de quinua del Perú, (Gestión, 2010). Con mercados abriéndose para este cultivo, se convierte en una gran alternativa de producción para los productores principalmente de las zonas más pobres del Perú.

### **2.1.3. Importancia nutricional y composición**

La quinua es una planta nativa alimenticia de alto valor nutritivo fue utilizada como alimento por los incas y culturas anteriores. La quinua sirve como un sustituto de proteínas de origen animal y en la actualidad es una de las principales fuentes de proteínas de la región. La importancia de estas proteínas se basa en su calidad, con una composición equilibrada de aminoácidos esenciales similar a la composición de la caseína, la proteína de la leche. (Repo, 2003).

Para algunas poblaciones del mundo incluir proteínas de alta calidad en sus dietas constituye un problema, especialmente en aquellas que raramente consumen proteína de origen animal y deben obtener proteínas de cereales, leguminosas y otros granos. Aun cuando el aporte energético de estos alimentos es adecuado, concentraciones insuficientes de aminoácidos esenciales (AAE) pueden contribuir a aumentar la prevalencia de la desnutrición (Mujica et al., 2001).

Según (Jubete et al., 2009) los resultados para los análisis de macro nutrientes de quinua, amaranto, trigo sarraceno y semillas de trigo se presentan en la Tabla II.

**TABLA II. CONTENIDO DE MACRO NUTRIENTES DE QUINUA, AMARANTO, TRIGO SARRACENO Y SEMILLAS DE TRIGO.**

<b>SEMILLA</b>	<b>PROTEINAS</b>	<b>GRASAS</b>	<b>ALMIDON TOTAL</b>	<b>FIBRA DIETETICA</b>	<b>CENIZA</b>
AMARANTO	16.5 ± 0.3	5.7 ± 0.3	61.4 ± 0.8	20.6 ± 1.1	2.8 ± 0.0
QUINUA	14.5 ± 0.3	5.2 ± 0.1	64.2 ± 1.3	14.2 ± 0.6	2.7 ± 0.0
TRIGO SARRACENO	12.5 ± 0.3	2.1 ± 0.1	58.9 ± 1.3	29.5 ± 1.2	2.1 ± 0.0
TRIGO	12.0 ± 0.1	2.5 ± 0.1	63.0 ± 1.4	17.4 ± 1.2	1.5 ± 0.0

Fuente: Jubete et al. (2009).

Datos expresados en porcentaje de peso seco básico ± desviación estándar. Los factores para la conversión de nitrógeno para proteína son 5,85, 5,96, 5,70 y 5,70 para la quinua, amaranto, trigo sarraceno y trigo, respectivamente.

En un estudio realizado por (Jubete et al., 2009), comparo el contenido de minerales de la quinua con relación al trigo y al amaranto resultando que, la quinua obtuvo los contenidos más altos de zinc como es apreciado en la tabla III

**TABLA III COMPARATIVO DE CONTENIDO DE ZINC**

<b>SEMILLA</b>	<b>CALCIO</b>	<b>MAGNESIO</b>	<b>ZINC</b>	<b>HIERRO</b>
Amaranto	180.1±6.1	279.2±1.1	1.6±0.0	9.2±0.2
Quinoa	32.9±3.3	206.8±6.4	1.8±0.0	5.5±0.5
Trigo	34.8±0.0	96.4±3.7	1.2±0.1	3.3±0.1

Fuente: Jubete et al. (2009).

Datos presentados en mg.100 g<sup>-1</sup> peso seco ± desviación estándar.

#### **2.1.4. Producción mundial**

Según los últimos datos publicados por la (FAO, 2009), en 2008 los tres mayores productores de quinua en el mundo fueron: Perú, Bolivia y Ecuador respectivamente, estos países responden prácticamente por toda la producción del mundo.

Según (FAO, 2009) la producción mundial de quinua en el año de 2008 fue de 59,115 toneladas aproximadamente 53.83% de toda la quinua producida en el mundo es de procedencia peruana, que es el principal productor de quinua con 31,824 toneladas, seguido por Bolivia con 44.99%

El rendimiento medio mundial avanzó poco, pasando de 0.6171 t/ha en 1961 para 0.7695 t/ha en 2008 (FAO, 2009). Aun el sistema de producción de quinua muestra un rendimiento bajo, debido principalmente a la baja tecnología aplicada, y en muchos de esos casos una buena parte de estas aéreas

corresponden a áreas conducidas bajo sistemas de producción tradicional, cuyos rendimientos siempre serán menores en comparación con una agricultura convencional.

#### **2.1.5. Producción en el Perú**

El Perú se destaca como el primer productor de quinua en el mundo, siendo que la producción de quinua, en la safra de 2008 fue de 31,824 toneladas, la producción peruana corresponde a un 53,83% de la producción mundial (FAO, 2009).

Según el (MINAG, 2007), el área sembrada para la campaña agrícola 2007-2008 fue de 32,676 has, incrementándose en un 4.9% con relación a la campaña agrícola 2006-2007. Por otro lado se aprecia que el 77.17% del total del área sembrada para la campaña 2007-2008, corresponden al departamento de Puno.

#### **2.2. Agrotóxicos**

Los agrotóxicos y el manejo químico de los problemas fitosanitarios enfrentados en la agricultura, constituyen técnicas adoptadas muy difundidas en los padrones practicados en los principales centros mundiales de producción de alimentos, en los últimos 40 años. Algunos autores sustentan que las pérdidas globales de los cultivos debido a los ataques de las plagas y enfermedades podrían sufrir un aumento estimado en 42%, alcanzando a cerca del 70% de las pérdidas en la ausencia de las prácticas de control químico (Alves Filho, 2002).

### **2.2.1. Definición**

El código Internacional de conducta para La distribución y utilización de pesticidas (FAO, 2002) define a los agrotóxicos, como cualquier sustancia o mixtura de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieran de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, maderas y productos de maderas o alimentos para animales , o que puedan ser administrados a los animales para combatir insectos, arácnidos o otras plagas. El término incluye a las sustancias destinadas como reguladoras de crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de frutas o agentes para evitar la caída prematura de frutas y las sustancias aplicadas a los cultivos antes y después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte.

El residuo de pesticidas es definido por el Código Internacional, como cualquier sustancia específica presente en los alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales como consecuencia del uso de pesticidas. El término incluye cualquier derivado de pesticidas, como productos de conversión metabólicos, productos de reacción y impurezas consideradas de importancia toxicológica. El término "residuo de pesticida" incluye tanto los residuos de procedencia desconocida o inevitables (por ejemplo, ambientales), como los

derivados de usos conocidos de sustancias químicas (FAO, 2002 y D.S. 016-2000-AG,2000).

En el Perú, según el D.S. 016-2000-AG," se define como plaguicidas agrícolas a cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, repelentes, feromonas y todas las demás sustancias que ayuden a la acción del plaguicida. Asimismo, a las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte".

La principal diferencia observada entre las definiciones es que el Código Internacional también clasifica como agrotóxicos a las sustancias utilizadas después de la cosecha, para la protección del producto contra el deterioro durante el almacenamiento y el transporte.

El empleo de agrotóxicos en la agricultura tiene sus beneficios económicos, una vez que aseguran el control y combate de plagas y enfermedades, protegiendo la calidad de la producción. Por otro lado, los consumidores de estos productos agrícolas pueden estar expuestos a los agrotóxicos, debido a la presencia de estos en los alimentos. Entre los efectos nocivos causados al

hombre, por estas substancias, podemos citar: daños al sistema nervioso central, problemas en el sistema reproductivo y locomotor, deficiencia mental, entre otros (Alder et al., 2006).

### **2.2.2. Historia en el mundo**

El desarrollo de la síntesis orgánica durante la Segunda Guerra Mundial y la consolidación de la agricultura llamada de moderna tuvieron una importancia fundamental en el desarrollo de la industria mundial de los agrotóxicos. En 1939, con el descubrimiento de las propiedades insecticidas del DDT ( Dicloro Difenil Tricloroetano), un compuesto orgánico sintetizado por Otto Ziedler en 1874, fue dado inicio al marco revolucionario en las tecnologías hasta entonces empleadas para el control de las plagas (Alves Filho, 2002 y Spadotto et al., 2004).

A partir del año 1991, el Perú según el Decreto Supremo N° 037-91-AG (12.09.91), prohíbe la importación y registro de insecticidas de origen organoclorados.

Ya, en la década de los 60 comenzaron a surgir nuevos productos clasificados como "tercera generación" (productos biológicos, fisiológicos, ferormónicos y piretroides), en una fase donde la búsqueda de productos menos tóxicos para el hombre y el ambiente pasaron a ocupar la estrategia de la industria química. Esa preocupación ocurrió debido a graves problemas identificados, tanto relacionados a los procesos de intoxicaciones agudas y crónicas sufridas por las poblaciones expuestas directa o indirectamente, como por los accidentes ambientales y problemas de eficiencia agronómica de los productos, estos últimos

desencadenados por los mecanismos de resistencia y las poblaciones de las plagas a los productos utilizados (Alves Filho, 2002).

Los avances en los estudios entomológicos permitieron la creación de productos de “cuarta generación” que poseen algunas ventajas, como alta capacidad de degradación ambiental y especificidad de acción, la utilización de sustancias químicas para el control de plagas a partir del desarrollo de productos sintéticos siempre causo conflictos sobre los prejuicios reales y beneficios derivados de los agrotóxicos (Alvez Filho, 2002).

El uso de agrotóxicos de origen organoclorado hasta el año de 1991, era de uso común en el Perú, productos tales como Aldrin, Endrin, Dieldrin, BHC/HCH, Heptacloro, Canfecloro/Toxafeno, 2,4,5-T y DDT, luego después prohibido su importación e registro mediante el Decreto Supremo N° 037-91-AG.

### **2.2.3. Clasificación**

Los agrotóxicos pueden ser clasificados cuanto a la finalidad (aficida, ovicida, larvicida, raticida, formícida, acaricida, insecticida, entre otros), toxicidad, al modo de acción (ingestión, contacto, microbiano, fumigante), y a su estructura química, siendo clasificados en clorados, fosforados, carbamatos, piretroides, triocarbamatos, benzimidazoles, derivados de la urea, tiadiazinona, triazoles, etc. En cuanto al origen, la división envuelve los compuestos inorgánicos (compuestos de mercurio, bario, azufre y cobre), los agrotóxicos de origen vegetal, bacteriana e fungicida (piretroides, antibióticos y fitocidas) y los agrotóxicos orgánicos (Cella, 2002 y Sanchez et al.,2003).

Con relación a la persistencia, los agrotóxicos son clasificados según el tiempo de media vida, que es el tiempo necesario para que la concentración de los agrotóxicos sea reducida para la mitad de la cantidad aplicada, a través de procesos de degradación biológica o química. Las persistencias consideradas son: corta (hasta 90 días); media (91 a 180 días); larga (mayor que 180 días). El desplazamiento de los agrotóxicos en el perfil de los suelos durante su vida media puede ser pequeño (hasta 20), media (de 21 a 60 cm) o grande (mayor de 60 cm). (Sanches et al., 2003 y Shen; Hu; Hu, 2009)

#### **2.2.4. Toxicidad**

Con el objetivo de distinguir su grado de toxicidad, los agrotóxicos son clasificados en cuatro clases toxicológicas. Esta clasificación es basada en la identificación del componente de riesgo referente a una sustancia química y diferencia la toxicidad de los agrotóxicos, con base en el ingrediente activo y su formulación Sanches et al., (2003). La toxicidad de la mayoría de los agrotóxicos es expresada en valores referentes a la dosis media letal ( $DL_{50}$ ), por vía oral representada por miligramo del ingrediente activo del producto por kilogramo de peso vivo, que son necesarios para matar 50% de la población de ratas o de otro animal de prueba. La  $DL_{50}$  es usada para establecer las medidas de seguridad a ser seguidas para reducir los riesgos que el producto puede presentar a la salud humana (Barrigossi, 2006).

Los agrotóxicos son agrupados en clases, de acuerdo con su toxicidad, y en el Perú las formulaciones son obligadas a presentar en la etiqueta del embase el color correspondiente la clase de su toxicidad, conforme demostrado en la tabla IV.

**TABLA IV. CLASES TOXICOLÓGICAS DE LOS AGROTÓXICOS Y SUS RESPECTIVOS COLORES EN LAS ETIQUETAS DE LAS FORMULACIONES.**

<b>CLASE</b>	<b>CLASIFICACIÓN</b>	<b>COLOR DE LA ETIQUETA</b>
I	Extremadamente toxico (DL <sub>50</sub> de 50 mg/kg de peso vivo)	Rojo vivo
II	Altamente toxico (DL <sub>50</sub> de 50 mg a 500 mg/kg de peso vivo)	Amarillo intenso
III	Medianamente tóxico (DL <sub>50</sub> de 500 mg a 5.000 mg/kg de peso vivo)	Azul intenso
IV	Poco tóxico (DL <sub>50</sub> mayor que 5.000 mg/kg de peso vivo)	Verde intenso

Fuente: Barrigossi (2006)

### **2.2.5. Límites máximos de residuos (LMR)**

La protección de los cultivos contra el ataque de insectos, plantas invasoras de cultivo e enfermedades, utilizando agrotóxicos es una práctica bastante común en la agricultura. Por tanto, cuando la utilización de agrotóxicos no es realizada de acuerdo con las Buenas Prácticas Agrícolas, residuos de estos compuestos pueden ser encontrados en los alimentos.

El riesgo potencial que los agrotóxicos ofrecen a los consumidores, debido a una exposición crónica diaria, determinó que LMR's fueran establecidos para diferentes combinaciones cultivo/agrotóxico. En función de esto, varios países poseen programas de monitoramiento de los niveles de residuos de agrotóxicos, a fin de garantizar la seguridad alimentaria (Stepan et al, 2005).

El límite máximo de residuos es definido, según el Código Internacional de conducta para la distribución y utilización de pesticidas (FAO, 2002) como la concentración máxima de un residuo de pesticidas que se permite o reconoce legalmente como aceptable en un alimento, productos agrícolas y ración para animales.

En el Perú, el monitoramiento de residuos de pesticidas en alimentos es realizado por el SENASA, a pedido de los interesados con fines de exportación, servicio que es prestado por esta institución. Y por lo tanto no existe un programa de monitoramiento de residuos de agrotóxicos en alimentos, el cual informe a la población nacional que cantidades de residuos de agrotóxicos están siendo consumidos conjuntamente con los alimentos.

Los LMR's establecidos por el Codex Alimentarius están basados en las prácticas agrícolas internacionales con el objetivo de proteger y preservar la salud humana, garantizando el comercio internacional de alimentos libres de barreras, con respecto a los residuos. Con todo, el nivel de residuos de agrotóxicos en alimentos depende también de factores agronómicos, climáticos y muchos países establecen sus propios límites basados en las buenas prácticas agrícolas que son practicadas localmente (Imoto, 2004).

Probablemente no hay otra clase de compuestos químicos tan reglamentada como la de los agrotóxicos, los LMR's establecidos en la mayoría de los países, existen para impedir impactos adversos en la salud pública y para promover buenas prácticas en la agricultura. Debido a estas razones un grande número de laboratorios en el mundo están envueltos en la vigilancia de estos límites o en la identificación y cuantificación de agrotóxicos en los más diversos tipos de matrices (Alder et al., 2006).

#### **2.2.6. Uso de agrotóxicos en el cultivo de quinua.**

Al principio, todos los cultivos requieren el control de plantas invasoras de cultivo, enfermedades y plagas. La selección del método de control de plagas normalmente es hecha basándose en la información disponible sobre la estimativa de la pérdida, eficiencia del método, costo del control e impacto ambiental. (EMBRAPA, 2003).

No existe una reglamentación específica con relación al tipo de agrotóxicos que pueden ser usados en determinados cultivos, siendo usados indistintamente para todos los cultivos, según sea el problema; existe una recomendación realizada por el INIA en la cual manifiesta que pueden ser usados algunos productos tales como: Baytroid TM 525, Bulldock 025 FC, Metasistox, Lorsban 2.5 P. Seco. Para el control de algunas plagas y enfermedades del cultivo de quinua.

#### **2.3. Análisis de agrotóxicos en alimentos**

Estadísticas indican que la agricultura mundial, una cantidad de un billón de toneladas, es anualmente afectadas por plagas y que la reducción de producción debido a la invasión de plagas alcanza de 20 – 30%. Los agrotóxicos desempeñan

un papel muy importante en el desenvolvimiento de la agricultura desde su descubrimiento y síntesis, aumentaron significativamente la producción agrícola e impulsaron la pecuaria, pero los peligros ocasionados por su aplicación reflejan en la preocupación con la seguridad alimentaria y la salud humana, siendo cada vez más el foco de atención mundial. Así, diversos países tienen establecidos sus propios límites de residuos en el comercio internacional y muchos métodos analíticos vienen siendo desarrollados para ser aplicados en la determinación de residuos de agrotóxicos en diferentes tipos de alimentos (Pang et al., 2006).

Las propiedades físico-químicas de los agrotóxicos pueden variar considerablemente, una vez que, pueden presentar carácter ácido, básico y neutro. Estos compuestos pueden contener en su estructura, halógenos, fósforo, azufre o nitrógeno, heteroátomos que poseen una grande relevancia en el método de detección de estos compuestos. Un gran número de agrotóxicos son muy volátiles, otros no, esta grande diversidad provoca serios problemas en el desarrollo de un método "universal" para el análisis de residuos de estos compuestos (Alder et al., 2006).

Existen muchos métodos para análisis multiresiduos de agrotóxicos en productos agrícolas, pero es fundamental que la técnica pueda extraer decenas o centenas de sustancias de matrices complejas, que gran cantidad de interferentes co-extraídos puedan ser eliminados en la etapa del *clean-up*, y que las técnicas analíticas de detección adoptadas sean indicadas para la determinación (Pang et al., 2006).

El análisis de residuos de agrotóxicos, más allá de ser un instrumento de protección a la salud humana, está también relacionada a factores económicos.

Actualmente, se estima que en el mundo, cerca de 200.000 muestras de alimentos son analizados anualmente para residuos de agrotóxicos con una variedad de propósitos (Lehotay, 2005).

En las últimas décadas, los métodos para determinación de residuos de agrotóxicos cambiaron considerablemente. Desde 1970 los análisis de residuos de agrotóxicos de rutina eran conducidos por cromatografía a gas en combinación con captura de electrones, nitrógeno y fósforo, o detectores fotométricos de llama, para la confirmación de los resultados era necesaria la utilización de cromatografía a gas equipada con un tipo diferente de columna o detector. Actualmente, utilizando cromatografía a gas acoplada a espectrometría de masas, son realizados simultáneamente la determinación y confirmación de residuos de agrotóxicos en una misma corrida analítica. En la mayoría de los casos, la sensibilidad obtenida con CG-EM es semejante a la de CG con detectores clásicos. La selectividad del sistema CG-EM puede ser ajustada por la selección adecuada de los iones resultantes de la fragmentación de las moléculas para evitar interferencias de materiales co-extraídos de la muestra. Así, la importancia de CG con detector de captura de electrones, nitrógeno y fósforo el detector fotométrico de llama fue disminuyendo en laboratorios de residuos de agrotóxicos. (Alder et al., 2006).

En el pasado métodos basados en cromatografía líquida (CL) eran poco aplicados para análisis de residuos porque los detectores tradicionales UV (ultravioleta), matriz de diodos y fluorescencia son menos selectivos y sensibles que los instrumentos CG. Pero en los últimos años, la disponibilidad de la ionización a presión atmosférica (atmospheric pressure ionization . API) ocasionó

un espectacular cambio, pues en combinación con la EM aumento la sensibilidad de detección CL en varios ordenes de grandeza, comparado a los tradicionales detectores electrospray (electrospray ionization – ESI) y la ionización química a presión atmosférica (atmospheric pressure chemical ionization . APCI). Más allá de eso, las técnicas de cambio de columna de la CL y extensos procesos de limpieza de la muestra se tornaron desnecesarias si el acoplamiento EM-EM fuera utilizado y operado en el modo de monitoración de reacción seleccionada (selected reaction monitoring. SRM) (Alder et al., 2006).

El monitoramiento de agrotóxicos en los alimentos es una herramienta importante para la caracterización e gerenciamiento de los riesgos producto del uso de esos productos en las condiciones reales de aplicación. El monitoramiento de uso de agrotóxicos en el campo es una práctica de difícil control, pudiendo ocurrir uso inadecuado de ingredientes activos en los cultivos o las cosechas anticipada de materia prima antes del término del período de carencia del producto aplicado (Godoy; Oliveira, 2004).

Los datos obtenidos en programas de monitoramiento posibilita verificar la calidad y seguridad de los alimentos consumidos por la población con la identificación de fuentes de contaminación, proporcionando una evaluación cuanto al uso inadecuado y no autorizado de agrotóxicos, para estimar la adopción de las Buenas Prácticas Agrícolas, más allá de proveer subsidios para una posible reevaluación de los agrotóxicos (Imoto, 2004).

### 2.3.1. Extracción de agrotóxicos

En los últimos años, la preocupación con la seguridad alimentaria ocasionó un rápido desarrollo de métodos analíticos necesarios para la determinación de residuos de agrotóxicos. La investigación sobre residuos en el área ambiental y en la salud pública esta direccionada para la identificación y cuantificación de centenas de sustancias con diferentes propiedades físico-químicas en diferentes tipos de matrices. Así, una de las principales tareas de la investigación analítica es proporcionar métodos confiables, de fácil aplicación y con bajo costo (Anastassiades et al., 2003).

El desarrollo de un método para análisis de residuos de agrotóxicos en alimentos es dificultado por diversos factores, tales como tiempo, necesidad de grandes cantidades de solventes orgánicos, varias etapas de extracción, tornando al análisis extremadamente laborioso (Frenich et al., 2007).

Los métodos multiresíduos son comúnmente preferidos para determinación de residuos de agrotóxicos por que permiten la determinación de varios compuestos en una única corrida analítica. Diversas investigaciones relacionadas a la determinación de residuos en frutas y legumbres indican que nuevos métodos están siendo desarrollados para la extracción y cuantificación de agrotóxicos. Estos métodos envuelven: homogenización, extracción, *clean-up* de los analitos de la muestra con solventes adecuados, concentración y determinación analítica. El paso del *clean-up* es el más trabajoso y demorado y es crucial en el análisis de residuos en alimentos. Se no fuera realizado con precisión, los problemas relacionado con la presencia de interferentes en la matriz convierten difícil la identificación de los compuestos. El *clean-up* debe ser realizado a fin de evitar

pérdidas de analitos más volátiles, debe ser suficientemente global para eliminar compuestos co-extraídos de la matriz; evitar falsos positivos, y permitir la identificación, cuantificación e confirmación del analito (Lacorte, 2005).

Dentro de las técnicas de extracción normalmente utilizadas para análisis de residuos se destacan líquido-líquido (liquid-liquid extraction–LLE). La extracción con fluido super crítico (supercritical fluid extraction-SFE), la extracción en fase sólida (solid phase extraction – SPE), dispersión de la matriz en fase sólida (matrix solid phase dispersión - MSPD), y recientemente la micro extracción en fase sólida (solid phase micro-extraction – SPME) y extracción en fase sólida dispersiva (dispersive solid-phase extraction - dSPE) (Barrionuevo, 2001; Anastassiades, 2005 y Tadeo, 2008).

La técnica de extracción de agrotóxicos más frecuentemente usada es la extracción Líquido-Líquido (LLE). Entretanto, es un método tedioso, de elevado costo, de difícil automatización y que consume grandes cantidades de solventes orgánicos (Lanças, 2004).

La Figura 1 muestra como es realizado el proceso de extracción de los analitos de una partícula sólida. En el primer paso (paso 1) el solvente debe penetrar dentro de los poros de las partículas de la muestra para lograr la desorción de los analitos (A) ligados de los sitios activos de la matriz (paso 2) subsecuentemente los analitos (A) fluyen a través de la matriz (paso 3) para ser disueltos en el extracto del solvente (paso 4) seguidamente los analitos (A) disueltos se difunden a través del solvente dejando los poros de la muestra (paso 5) dejándose llevar finalmente por el solvente externo (paso 6) obviamente una

buena selección del solvente a ser utilizado es un factor clave en el éxito de la extracción (Tadeo, 2008).

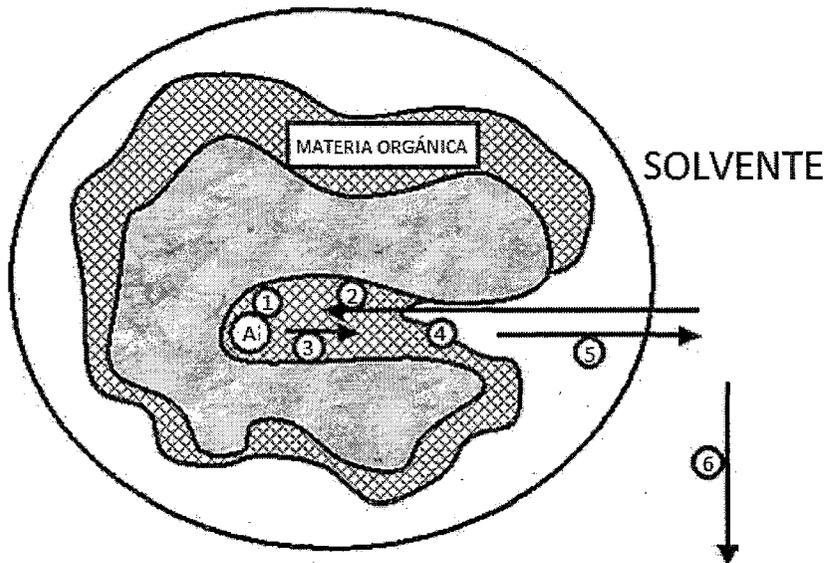


Figura 1: Diferentes pasos envueltos en la extracción de los analitos objetivos de una partícula sólida. Fuente Tadeo (2008).

La SPE es una de las técnicas de extracción más utilizadas. En esta técnica, los analitos contenidos en una matriz acuosa son extraídos, juntamente con los compuestos interferentes, después de pasar por un cartucho conteniendo adsorbente. Un solvente orgánico selectivo es generalmente utilizado para remover los interferentes y entonces, otro solvente es usado para lavar los analitos de interés. A pesar de la SPE presentar ventajas con relación a los métodos más clásico, tales como practicidad y mayor sensibilidad, esta técnica tiene algunas limitaciones. Una de ellas se refiere a la etapa de desorción del analito aprisionado

en el cartucho de la SPE que requiere generalmente, el uso de solventes tóxicos (Barrionuevo; Lanças, 2001).

La MSPD envuelve la homogenización y dispersión de una pequeña cantidad de matriz con adsorbente generalmente C<sub>18</sub> (octadecilsilano), seguido por lavado con una pequeña cantidad de solvente y elución adecuada para extraer una vasta gama de compuestos (Dórea; Lanças, 1999).

La SPME se basa originalmente en la absorción de los analitos de una fibra de sílica cubierta con una camada de adsorbente. La fibra es introducida directamente en la muestra acuosa y, por partición, concentra el analito en su superficie (adsorbente). Posteriormente, los analitos son desabsorbidos térmicamente en un cromatógrafo a gas, es un método rápido, que no requiere de uso de solventes (Barrionuevo; Lanças, 2001).

### **2.3.2. Método QuEChERS – extracción en fase sólida dispersiva (dSPE).**

La utilización de una etapa de *clean-up* (limpieza) anterior al análisis cromatográfico es importante, una vez que reduce el background o el efecto matriz, además de disminuir los mantenimientos al sistema cromatográfico. (Anastassiades et al., 2003) Introdujeron un método para la extracción de residuos de agrotóxicos denominado QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe). Este método envuelve una única extracción inicial de 10g de muestra con 10 mL de acetonitrilo (MeCN), seguida por la partición líquido-líquido formada por la adición de 4g de sulfato de magnesio anhidro (MgSO<sub>4</sub>) más 1g de cloruro de sodio (NaCl). La remoción de agua residual y el *clean-up* son

realizadas simultáneamente por medio de un procedimiento rápido llamado extracción en fase sólida dispersiva con PSA (amina primaria, secundaria) son simplemente mezclados con 1 ml del extracto en MeCN. La extracción en fase sólida dispersiva con PSA efectivamente elimina muchos componentes polares de la matriz, tales como ácidos orgánicos, ciertos pigmentos polares y azúcares. La CG-EM es entonces utilizada para la confirmación y cuantificación de los agrotóxicos. Recuperaciones entre 85 y 101% (comúnmente > 95%) y respectivamente típicamente <5% fueron alcanzados para una vasta gama de agrotóxicos analizados, incluyendo muchos polares y compuestos básicos, tales como metamidofos, acefato, ometoato, imazalil y tiabendazol. Usando este método, un único analista puede preparar un lote de 8 muestras anteriormente homogenizadas en menos de 30 min, con aproximadamente \$ 1 dólar de materiales por muestra.

Por lo tanto, la degradación de ciertos agrotóxicos, como por ejemplo folpete, captan, diclofluanida y clorotalonil, puede ocurrir durante la etapa de extracción debido al medio básico. A fin de minimizar este problema, una etapa de tamponamiento del extracto fue adicionado lo que promovió un mejoramiento en los resultados obtenidos para aquellos agrotóxicos difíciles de ser analizados. El método QuEChERS con etapa de tamponamiento envuelve la extracción con MeCN conteniendo 1% de ácido acético (v/v) y simultáneamente partición líquido-líquido promovida por la adición de acetato de sodio (NaAC) y  $MgSO_4$ . Lo cual es conocido como método QuEChERS modificado (Lehotay et al., 2005).

Una ventaja del empleo de MeCN en la etapa de la extracción es que cuando comparada con otros solventes miscibles en agua, la MeCN es superior principalmente porque ofrece mejor separación en la presencia de NaCl y MgSO<sub>4</sub>. La presencia de agua en los extractos conduce a un mayor porcentaje de componentes polares co-extraídos, tales como proteínas y carbohidratos. Así, la MeCN minimiza la extracción de proteínas e carbohidratos que serán eliminados en la fase acuosa de la extracción. El MgSO<sub>4</sub> fue señalado como mejor desecante para remoción de agua en soluciones como MeCN, su hidratación es altamente exotérmica (aproximadamente 40°C), y el calor generado durante la extracción demuestra que el agua reacciona con el deshidratante del extracto. El aumento de la temperatura durante la extracción no es suficiente para volatilizar o degradar los agrotóxicos, tornando la extracción más efectiva y auxiliando en la remoción de agua (Lehotay, 2000 y Lehotay et al., 2001).

La dSPE depende apenas del proceso de extracción para proporcionar una alícuota homogénea a partir de una muestra original de cualquier tamaño, siendo que apenas una pequeña cantidad de adsorbente es utilizado, al utilizar una cantidad muy menor de adsorbente, la dSPE economiza tiempo, trabajo, dinero y solvente, en comparación con el abordaje tradicional SPE. No es necesario el acondicionamiento de cartuchos, no exige capacidad analítica y diferentemente del formato de los cartuchos, todo el adsorbente interrelaciona igualmente con la matriz en dSPE, y una mayor capacidad por miligramo de adsorbente es alcanzada (Amastassiades et al., 2003).

Diez et al. (2006). Realizaron una comparación entre los métodos de QuEChERS empleando MeCN en la extracción; el método mini luke; el método de extracción con acetato de etila, que envuelve un posterior *clean-up* por cromatografía de permeación en gel (gel permation chromatography GPC) y que el método de extracción oficial utilizado por algunas agencias reguladoras europeas; y aun con una simple extracción en acetona para verificar las diferencias entre los métodos. Los extractos fueron analizados por CG con detectores de espectrometría de masas por tiempo de vuelo (time of fligth – TOF) y por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (liquid chromatography-tanden mass spectrometry – LC – MS/MS).

En esta comparación, en todos los procedimientos fue encontrado efectos introducidos por la matriz, incluyendo o no la etapa de *clean-up*, siendo necesario cuantificar los agrotóxicos con solución padrón en los extractos, los extractos obtenidos por el método QuEChERS no fueron tan limpios en comparación a los realizados por GPC, mas no diferían tanto, considerando que el *clean-up* por el QuEChERS es mucho más fácil y menos demorado. En fin los resultados presentados por el método QuEChERS con menor tiempo de extracción y pequeño volumen de solvente orgánico utilizado, se muestra mucho más promisorio en comparación a las extracciones por procedimientos más complicados (Díez et al., 2006).

El método mini-Luke se mostro más eficiente para la extracción de compuestos más polares y medianamente polares, en cuanto las mejores recuperaciones para compuestos polares fueron obtenidas por el método

QuEChERS y por el método de acetato de etila en la extracción. QuEChERS fue el único método que presentó recuperaciones entre 60 y 70% para todos los compuestos, con algunas excepciones debido a la interferentes en la matriz. El *clean-up* por extracción en fase sólida dispersiva fue eficiente y no difirió mucho de los extractos obtenidos por el método de extracción con acetato de etila (Díez et al., 2006)

Modificaciones del método original QuEChERS ya fueron recientemente realizadas con el objetivo principal de analizar matrices con alto contenido de grasas utilizado en la etapa del *clean up* C<sub>18</sub> y carbón activo grafitizado (graphititized carbón Black – GCB) (Iehotay; Mastovska; Yun, 2005).

**TABLA V- PUBLICACIONES RECIENTES DE ANÁLISIS DE MULTIRESÍDUOS  
UTILIZANDO EL MÉTODO QUECHERS EN DIFERENTES MATRICES.**

Artículo	Autores	Matriz	N° de Agrotóxicos seleccionados
Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables	Lehotay, S.J et al., 2010	Frutas y vegetales	32
Analysis of pesticides residues in bananas harvested in the Canary Islands (Spain)	Hernández, Borges et al., 2009.	Plátano	11
Development of a matrix solid-phase dispersion method for the simultaneous determination of pyrethroid and organochlorinated pesticides in cattle feed	Fernandez Alvarez et al., 2009.	Ración bovina	36
Fast low-pressure gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of multiple pesticides in grapes, must and wines.	Cunha et al., 2009.	Uva, mosto y vino	27
Fast CG-MS Pesticides in cereal using the QuEChERS method and CG-ITD.	Huskova; Matisová; Kirchner, 2008.	Manzana	61

Fuente: Elaboración propia

### **2.3.3. Análisis de agrotóxicos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas**

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC o CLAE) es una de las principales técnicas utilizadas en el análisis de compuestos no volátiles y/o térmicamente inestables. A pesar de ser una excelente técnica de separación, la HPLC necesita de una técnica confirmatoria cuando el análisis cualitativo (confirmación de la identidad química) es también necesaria. Dentro de las varias opciones existentes en este momento en el mercado, la espectrometría de masas es la técnica que mejor proporciona las informaciones estructurales necesarias, el acoplamiento entre estas dos técnicas da origen a una herramienta analítica versátil y de grande potencial en el análisis cualitativo y cuantitativo: la LC/MS (cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas. (Lanças, 2009).

Actualmente, la espectrometría de masas es una técnica más frecuentemente utilizada en la ejecución de análisis cuantitativa. Su especificidad, selectividad y límite de detección característicos son más que suficientes para enfrentar a la mayoría de los problemas analíticos, el desenvolvimiento de la MS en los últimos años llevó esta técnica a ser aplicada en prácticamente todos los campos analíticos. La espectrometría de masas es basada en la producción de ions del analito, en el análisis con relación a la masa/carga ( $m/z$ ). y los valores de detección. Consecuentemente, a nivel instrumental tres componentes son esenciales: fuente de ions, analizador de masas y detector; la performance de estos tres componentes refleja sobre la calidad de los datos cuantitativos y cualitativos (Lavagnini et al., 2006).

La producción de iones es un fenómeno que afecta fuertemente la calidad de los datos obtenidos. Escoger el método de ionización a ser empleado depende de las propiedades físico-químicas de los analitos de interés (volatilidad, peso molecular, termoestabilidad y la complejidad de la matriz) (Lavagnini et al., 2006).

Las fuentes de iones normalmente utilizadas pueden ser subdivididas en dos clases principales: las que exigen muestras en la fase gaseosa antes de la ionización, y aquellas capaces de registrar muestras de baja volatilidad y alto peso molecular. La primera categoría incluye ionización por impacto de electrones (electron impact ionization – EI) y ionización química (chemical ionization- CI) que representa las fuentes más difundidas en el mundo entero, debido a su amplia utilización en sistemas CG-EM, la segunda categoría puede ser dividida en las que operan con soluciones de muestras ionización electrospray (electrospray ionization . ESI), ionización química a presión atmosférica, fotoionización a presión atmosférica (atmospheric pressure photoionization – APPI) y aquellas basadas en muestras desorbidas y ionizadas de un sustrato sólido ionización /desorción a laser de matriz asistida (matrix-assisted laser desorption/ionization.- MALDI) y ionización/desorción con laser (laser desorption ionization- LDI) (Lavagnini et al 2006).

Hay determinados puntos que son comunes en los documentos oficiales que tratan de los criterios de confirmación, como por ejemplo: la determinación del tiempo relativo de retención y selección de los iones para cada analito. Las directrices para monitoramiento de agrotóxicos en la Unión Europea establecen una exigencia mínima de tres iones de razón  $m/z$  100 o dos de razón  $m/z > 200$ .

Otras exigencias en la selección del ion en el modo SIM incluyen preferencialmente el ion molecular, o ions con intensidades mayores que 30% (Soboleva et al., 2004).

En los análisis multiresíduos, donde la identificación de más de 250 compuestos con diferentes propiedades es muy común, algunos criterios son difíciles o imposibles de aplicar, debido a las diversas razones prácticas. Uno de los problemas es la falta de un número suficiente de ions con abundancia exigida en los espectros de masas de algunos agrotóxicos (Soboleva et al., 2004).

#### **2.3.4. Efecto matriz**

En los métodos empleados para los análisis multiresíduos de agrotóxicos en alimentos, las diferentes propiedades físico-químicas de los analitos de interés tornan bastante difícil la remoción eficiente de los componentes endógenos de la matriz, haciendo con que estos estén presentes en el extracto final de la muestra juntamente con los analitos blanco, mismo después de un extensivo *clean-up*, pues estos interferentes son normalmente solubles en los solventes utilizados en las etapas de extracción y *clean-up* (Schenck et al., 2002).

Extensivos *clean-up* de los extractos pueden resultar en pérdida parcial de algunos de los compuestos, bien como en un aumento en el costo y trabajo, un *clean-up* inadecuado puede llevar a efectos adversos relacionados con la calidad de los datos generados, tales como: enmascaramiento de picos de residuos por componentes de la matriz coludidos, ocurrencia de falsos positivos y cuantificación inexacta. Los problemas debido a la presencia de impurezas en la muestra

analizada pueden ser encontrados en el detector y en el inyector. En este último caso, con el aumento de la transferencia de componentes co-extraídos de la matriz para la columna cromatográfica puede ocurrir, debido al bloqueo de los sitios activos dentro del inyector por estos compuestos, el impedimento de la degradación/adsorción térmica de los analitos de interés en el inyector, aumentando así la respuesta cromatográfica. Ese fenómeno conocido como "efecto matriz" permite explicación para las recuperaciones superiores a 100%, que son relatadas para algunos agrotóxicos estudiados utilizando padrones de calibración disueltos en solvente puro. La extensión de este efecto de matriz está relacionada a la estructura química e al tipo de matriz (Hajslova et al., 1998).

Este fenómeno resultante del efecto causado por la presencia de la matriz en el aumento de la respuesta cromatográfica es conocido como "respuesta cromatográfica aumentada, inducida por la matriz", el cual fue discutido por la primera vez por Erney et al. (1993) durante el análisis de residuos de agrotóxicos roganofosforados en muestras de leche y mantequilla.

La presencia de varios lugares activos en el sistema cromatográfico, principalmente en el liner (grupos silanois libres y metales potencialmente presentes en la superficie, mismo cuando producidos con vidrios de alta calidad, clasificados como "desactivados", puede ser responsable por la adsorción y/o descomposición (catalítica/térmica), de analitos susceptibles, disminuyendo la cantidad de moléculas del respectivo analito, que son introducidas en la columna. Cuando los analitos son inyectados en la presencia de la matriz, los componentes endógenos de esta compiten con los analitos por los sitios activos del liner,

haciendo con que las interacciones del analito en el inyector sean disminuidas y permitiendo que una cantidad mayor de moléculas del analito sean introducidas en la columna, mejorando la eficiencia de la inyección para el analito blanco (Hajsola et al., 2003). Una ilustración simplificada de este proceso es representada en la Figura 2.

En la figura 2 podemos apreciar una ilustración simplificada de la causa del efecto de matriz en el aumento de la respuesta cromatográfica ; C-número de moléculas del analito inyectadas; X e Y- número de lugares activos libres para la absorción de moléculas en el inyector; ● moléculas del analito en la muestra inyectada; □ porción de las moléculas del analito absorbido en el liner, ▲ moléculas de los componentes de la matriz en la muestra inyectada; Δ Porción de los componentes de la matriz absorbidos en el liner;  $(C-X) < (C-Y)$

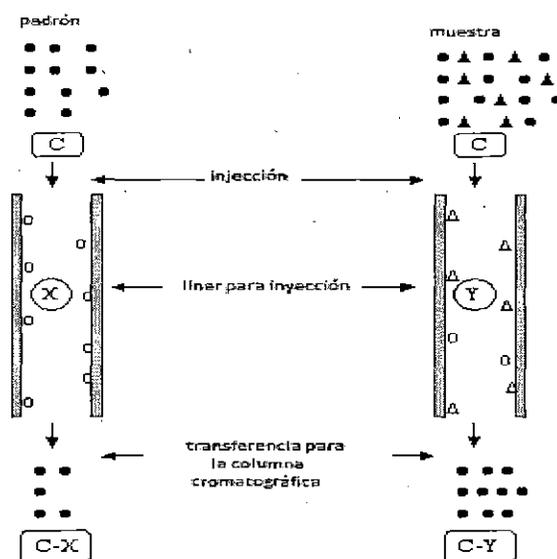


Figura 2. Ilustración del efecto matriz.

Fuente: Hajslova, Zrostl'kova (2003).

Los efectos de la matriz son muy variables en ocurrencia y intensidad y son resultantes de varios procesos químicos y físicos relacionados a la estructura química de los compuestos envueltos y a la naturaleza de la matriz, entre otros, siendo difícil eliminarlos (Hajasola et al., 2003).

Más allá de la estructura química del analito, la concentración del analito también desempeña una importante función, pues con la disminución de la concentración del analito la súper estimación del resultado se torna más pronunciado. La razón para este efecto es bien representada en la figura 2. La razón  $(C-X)/(C-Y)$  puede ser aumentada significativamente cuando la concentración del analito se aproxima a el nivel del trazo. Otro factor importante es la composición de la matriz en estudio, es decir, la característica y cantidad de co-extractivos derivados en la muestra sometida a el análisis cromatográfica (Hajslova; Zrostlýkova., 2003).

Existen algunas alternativas teóricas para evitar la súper estimación de los resultados debido al tipo de efecto matriz descrito; entre ellas están la eliminación de las causas primarias y/o su efectiva compensación, pero en la práctica son soluciones poco viables pudiendo aumentar el trabajo y el costo de los análisis (Hajslova; Zrostlýkova., 2003).

Una alternativa aparentemente simple para solucionar el problema creado por los lugares activos en el inyector sería enmascararlos intencionalmente, durante la inyección del padrón de calibración (Hajslova y Zrostlýkova, 2003). Para eso, uno de los abordajes más confiables es el uso de matrices fortificadas o

combinadas, es decir, padrones preparados en la misma composición de la matriz de la muestra analizada (blanco) (Zrostlýkova et al., 2001). Esta estrategia es recomendada por algunas guías para análisis de residuos, no en tanto, para propósitos de validación, la presencia o ausencia de efectos matriz debe ser demostrada sobre la faja de concentración de interés (INMETRO, 2007; EUROPEAN COMMISSION, 2007).

#### **2.4. Validación del método analítico**

La necesidad de mostrar que la calidad de las mediciones a través de comparabilidad, rastreabilidad e confiabilidad, está siendo cada vez reconocido y exigida. Para garantizar que un nuevo método analítico genere informaciones confiables e interpretables sobre la muestra, el debe sufrir una evaluación denominada de validación (Ribani et al., 2004). “la validación debe garantizar, a través de estudios experimentales, que el método atienda a las exigencias de las aplicaciones analíticas, asegurando la confiabilidad de los resultados” (BRASIL, 2003).

Dentro del contexto general de validación de métodos es posible distinguir dos tipos, siendo validación en el laboratorio (“in house validation”) que consiste en las etapas de validación dentro de un único laboratorio, sea para validar un método nuevo que haya sido desarrollado localmente o para verificar si un método adoptado de otras fuentes está siendo bien aplicado. La validación en el laboratorio es utilizada en las etapas preliminares del desarrollo de una metodología y en la publicación de artículos para revistas científicas, en que son evaluadas todas las características de desempeño de la validación de la

metodología, por lo tanto sin verificar la reproductibilidad. Se puede considerar esta etapa como siendo preliminar a la validación completa ("full validation, la validación completa, envuelve todas las características de desempeño de un estudio interlaboratorial utilizado para verificar cómo la metodología se comporta con una determinada matriz en varios laboratorios, estableciendo la reproductibilidad de la metodología y la incerteza expandida asociada a la metodología como un todo. Solo así la metodología puede ser aceptada oficialmente para una determinada aplicación (Ribani et al., 2004).

#### **2.4.1. Parámetros de validación**

Es necesario que los estudios de validación sean representativos y conducidos de modo que la variación de la faja de concentración y los tipos de muestras sean adecuados. Un método para un compuesto mayoritario requiere un criterio de aceptación y un abordaje diferente de un método desarrollado para análisis de residuos, los parámetros analíticos deben ser basados en la intención de uso del método. Por ejemplo, si un método será usado para análisis en nivel de residuos, no hay la necesidad de testar e validar la linealidad del método sobre toda la faja linear dinámica del equipamiento. De esta forma. Los experimentos puede ser limitados para lo que realmente son necesarios (Ribani et al., 2004).

Los parámetros analíticos normalmente considerados para validación de métodos de separación son: selectividad, linealidad y faja de aplicación, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación y robustez (Ribani et al., 2004).

### **2.4.2. Selectividad**

La necesidad de un método instrumental de separación es la capacidad de evaluar inequívocamente las sustancias en el examen (analitos) en la presencia de componentes que pueden interferir en su determinación en una muestra compleja. La selectividad evalúa el grado de interferencia de especies como otro ingrediente activo, impurezas y productos de degradación así como otros compuestos de propiedades similares que puedan estar, por casualidad, presentes. La selectividad garantiza que el pico de respuesta sea exclusivamente del compuesto de interés, la selectividad necesita estar asegurada para que la linealidad, exactitud y la precisión no sean comprometidas. El mismo significado está siendo frecuentemente usado para el término especificidad generando confusión desnecesaria. Esto puede ser evitado utilizando solamente el término selectividad, como es sugerido por la IUPAC. Un método instrumental de separación que produce respuesta para una única sustancia de interés puede ser llamado de específico y un método que produce respuesta para varios compuestos químicos, con una característica en común, puede ser llamado de selectivo. Desde que existen pocos métodos cromatográficos que responden a apenas una sustancia, el término selectividad es más apropiado (Ribani et al., 2004).

La selectividad puede ser obtenida de varias maneras. La primera forma de evaluar la selectividad es comparando la matriz limpia de sustancias de interés e la matriz adicionada con esta sustancia (patrón), siendo que en este caso, ningún interferente debe estar bien separado de los demás compuestos presentes

en la muestra. Una segunda manera es a través de la validación con espectrómetro de masas, que compara el espectro del pico obtenido en la separación con el del un patrón y se utiliza esto como un indicativo de presencia del compuesto puro (Ribani et al., 2004).

### 2.4.3. Linealidad y faja lineal de trabajo

Linealidad es la habilidad de un método analítico en producir resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en las muestras, en una dada faja de concentración. La cuantificación requiere que se conozca la dependencia entre la respuesta medida e la concentración del analito. La linealidad es obtenida por padronización interna o externa y formulada como expresión matemática usada para el cálculo de la concentración del analito a ser determinado en la muestra real (INMETRO, 2007). La ecuación de la recta que relaciona las dos variables es:

$$y = ax + b$$

Donde:

y = respuesta medida (área del pico)

x = concentración

a = inclinación de la curva de calibración = sensibilidad

b = intersección con el eje y, cuando x=0.

La linealidad de un método puede ser observada por el gráfico de los resultados de los ensayos en función de la concentración del analito o entonces calculada a partir de la ecuación de la regresión lineal, determinada por el método de los mínimos cuadrados.

El coeficiente de determinación ( $r^2$ ) es frecuentemente usado para indicar el cuanto puede ser considerado adecuado la recta como modelo matemático (INMETRO, 2007).

La faja linear de trabajo de un método de ensayo es el intervalo entre los niveles inferiores y superiores de concentración del analito en el cual fue demostrado ser posible la determinación con la precisión, exactitud y linealidad exigidas, sobre las condiciones especificadas para el ensayo. La faja linear es definida como la faja de concentración en la cual la sensibilidad puede ser considerada constante y es normalmente expresada en las mismas unidades del resultado obtenido por el método analítico (INMETRO, 2007).

#### **2.4.4. Sensibilidad**

La sensibilidad es un parámetro que demuestra La variación de la respuesta en función de la concentración del analito. Puede ser expresada por la inclinación de la recta de regresión de la calibración, y es determinada simultáneamente a las pruebas de linealidad. La sensibilidad depende de la naturaleza del analito y de la técnica de detección utilizada (INMETRO, 2007).

#### 2.4.5. Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección (LD) representa la menor concentración de la sustancia en examen que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, utilizando un determinado procedimiento experimental. El LD puede ser calculado de tres maneras diferentes: método visual, método relación ruido y método basado en parámetros de curva analítica (Ribani et al., 2004).

Por el método basado en parámetros de la curva analítica el límite de detección puede ser expresado como:

$$LD = 3,3 \frac{s}{S}$$

Donde:

s = desviación estándar estimada de la respuesta, o el coeficiente lineal de la ecuación.

S = inclinación ("slope") o coeficiente angular de la curva analítica (Ribani et al., 2004).

El límite de cuantificación (LC) representa la menor la menor concentración de la sustancia en examen que puede ser medida, utilizando un determinado procedimiento experimental. Así, como el LD, puede ser calculado de tres formas

diferentes: método visual, método relación señal-ruido y método basado en parámetros de curva analítica (Ribani et al., 2004).

Por el método basado en parámetros de la curva analítica el límite de cuantificación puede ser expresado como:

$$LC = 10 \frac{s}{S}$$

Donde:

s = desviación estándar estimada de la respuesta, o el coeficiente lineal de la ecuación.

S = inclinación ("slope") o coeficiente angular de la curva analítica (Ribani et al., 2004).

#### **2.4.6. Precisión**

La precisión es un término general para evaluar la dispersión de resultados entre ensayos independientes, repetidos de una misma muestra, muestras semejantes o padrones, en condiciones definidas. Es normalmente determinada para circunstancias específicas de medición y las dos formas más comunes de expresarla son por medio de la repetitibilidad y la reproductibilidad, siendo usualmente expresadas por la desviación estándar (INMETRO, 2007).

La precisión puede ser medida a través de la estimación de la desviación estándar relativa (RSD), también conocida como coeficiente de variación (CV).

$$CV(\%) = \frac{S}{x}$$

Donde:

S = Desviación estándar absoluto estimado.

X = Media aritmética de un pequeño número de mediciones (media de las de las determinaciones) (Ribanni et al., 2004).

#### **2.4.7. Exactitud**

Es definida como siendo la concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia aceptado como convencionalmente verdadero. Los procesos normalmente utilizados para evaluar la exactitud de un método son, entre otros: uso de materiales de referencia, participación en comparaciones interlaboratoriales y realización de ensayos de recuperación (INMETRO, 2007).

La exactitud del método debe ser verificada a partir de, mínimo nueve determinaciones contemplando el intervalo lineal del procedimiento, es decir tres concentraciones, baja, media y alta, con tres repeticiones cada uno. La exactitud es expresada por la relación entre la concentración media determinada experimentalmente y la concentración teórica correspondiente (BRASIL, 2003).

$$\text{Exactitud} = \frac{\text{concentración média experimental}}{\text{concentración teórica}} * 100$$

La limitación del procedimiento de recuperación es la que la sustancia adicionada no está, necesariamente, en la misma forma que está presente en la muestra. Eso puede implicar, por ejemplo, en la presencia de sustancias adicionadas en una forma que proporcione mejor detección, ocasionando evaluaciones excesivamente optimistas de la recuperación, por lo razón de otros componentes de matriz pudieran interferir en la separación, detección o en la cuantificación de sustancias, efectos de los componentes de la matriz deben ser investigados. Es importante considerar como la eficiencia del método varía en función de la concentración de la sustancia. En la mayoría de los casos, la dispersión de los resultados aumenta con la disminución de la concentración y la recuperación puede diferir substancialmente a altas y bajas concentraciones. Por ese motivo, la recuperación debe ser evaluada en la concentración esperada para el compuesto de interés (Ribani et al., 2004).

### **CAPITULO III**

### **METODOLOGÍA**

#### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

El desarrollo experimental consistió en la evaluación del método QuEChERS (Anastassiades et al., 2003) para la extracción de agrotóxicos en quinua, siendo sometidos al procedimiento de purificación por extracción en fase sólida dispersiva y análisis por LC MS-MS modo MRM.

Este estudio fue desarrollado en las instalaciones del Laboratorio de Ecotoxicología del Centro de Energía Nuclear en la Agricultura CENA de la Universidad de São Paulo, Piracicaba Brasil.

##### **3.1. Muestras de quinua**

Las muestras de quinua fueron colectadas en el departamento de Puno de las principales zonas productoras, muestras que fueron utilizadas para realizar la cuantificación de residuos de pesticidas.

Para los fines de evaluación del método analítico fue utilizada una muestra de quinua orgánica de la variedad "Real", procedente de los salares de Uyuni Bolivia, comercializada en el Brasil por la empresa "Vitales productos naturales".

### 3.2. Equipos

- Sistema LC MS-MS: Cromatógrafo líquido de la marca Agilent 1200
- Una bomba binaria.
- Columna Agilent eclipse plus C-18 3.0 x 100 mm, 3,5 µm.
- Sistema de inyección realizada mediante un *auto sampler*
- Espectrómetro de masas triple cuadrupolo Agilent 6410
- Procesador doméstico oster.
- Homogeneizador Ultra-Turrax Marconi modelo MA102 (12.000rpm).
- Centrifuga Beckman J2-HS.
- Balanza analítica de precisión con 4 casas decimales Shimadzu AX200.
- Balanza analítica con 2 casas decimales Gehaka BG 4400.

### 3.3. Software

- Sistema de adquisición de datos usando el software Agilent MassHunter data acquisition.
- Sistema de identificación de compuesto realizado usando el software Agilent MassHunter qualitative analysis.
- Sistema de cuantificación de los datos usando el software Agilent MassHunter quantitative analysis.

### 3.4. Fase sólida

Bondesil – PSA, 40µm Varian (N-Propiletlenodiaminossilano).

### 3.5. Solventes y soluciones

Acetonitrila (MeCN) HPLC/Spectro 99.9% Tedia Company, INC;

Ácido fórmico (HCOOH) 90.1% J.T.Baker;

Agua milli-Q.

### 3.6. Sales

Sulfato de magnesio anhidro (MgSO<sub>4</sub>), grado reactivo 97% Sigma-Aldrich;

Cloruro de sódio 99.5% (NaCl) Mallinckrodt.

### 3.7. Padrones analíticos

Los padrones de los agrotóxicos en estado sólido son presentados en la tabla VI los cuales fueron:

**TABLA VI. LISTA DE PADRONES ANALÍTICOS**

<b>Analito</b>	<b>Fabricante</b>	<b>% Pureza</b>
Acefate	AccuStandard, New Haven, USA	99.00
Atrazina	ChemService	98.90
Azoxistrobim	ChemService	99.50
Buprofezin	AccuStandard, New Haven, USA	99.00
Carbofurano	AccuStandard, New Haven, USA	99.50
Ciproconazol	ChemService	99.00
Clorpirifos	ChemService	99.80
Deltametrina	AccuStandard, New Haven, USA	99.00
Difeconazole	AccuStandard, New Haven, USA	99.00
Imidaclopride	ChemService	99.50
Malation	ChemService	99.50
Metamidofos	ChemService	98.10
Metolacoloro	ChemService	98.30
Metribuzin	ChemService	99.50
Monocrotofos	ChemService	99.00
Monuron	ChemService	97.00
Tiametoxam	ChemService	99.50
Triazofos	ChemService	99.50

### **3.8. Otros materiales**

- Jeringa de polipropileno descartable;
- Filtro de jeringa teflón PTFE Agilent 0.45  $\mu\text{m}$  25 mm;
- Tubo de centrifuga de teflón de 50 mL y 25 mL;
- Frascos de vidrio ámbar de diferentes volúmenes;
- Frasco ámbar con tapa de teflón 2 mL;
- Balones volumétricos de 10 y 25 mL;
- Pipetadores automáticos de 200, 1000 y 10000  $\mu\text{L}$ ;
- Micro jeringas de 100 y 250  $\mu\text{L}$ ;
- Otros materiales usuales en laboratorio (bequer, probeta, pipeta volumétrica, balón volumétrico, tubos de ensayo).

Todo el material de vidrio usado en el experimento fue sumergido en jabón alcalino Derquim LMO1 – Derquim ® (dilución 1:1000) durante 2 horas, lavado en agua corriente hasta completar la remoción del jabón, posteriormente se procedió a lavar con agua destilada y finalmente lavar con acetona, el secado del material de vidriería fue realizado en estufa a 30°C, seguido de identificación y cubrimiento con papel aluminio.

### **3.9. Preparación de la muestra para análisis**

Debido al difícil transporte de las muestras de quinua desde el Perú hasta el Brasil, por motivos fitosanitarios. Las muestras de quinua tuvieron que pasar por un proceso de pre molido para posteriormente ser colocados en sobres de papel aluminio, debidamente identificados, y colocados en caja de tecnopor para ser transportados vía aérea hasta el Brasil, las muestras fueron molidas en un

procesador de alimentos, para luego ser almacenadas bajo refrigeración a  $-18^{\circ}\text{C}$  en sobre de papel aluminio.

### **3.8. Preparación de las soluciones analíticas**

#### **3.8.1. Soluciones de padrones de los agrotóxicos**

El preparo de las soluciones fue realizado de acuerdo a lo descrito con Lehotay (2005). Soluciones individuales de los padrones analíticos de los agrotóxicos fueron preparados pesando 10 mg del padrón en frasco de vidrio ámbar, para seguidamente agregar 10 mL de MeCN, con lo que se obtuvo una solución estoque a una concentración de  $1\text{ mg mL}^{-1}$ , de donde se tomo una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  colocado en un balón de 10 mL, para completar ese volumen con 10 mL de MeCN, lográndose así una concentración de  $5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  ó  $5\text{ ng mL}^{-1}$  seguidamente de esta solución fue realizada la dilución para la realización de la curva de calibración en las concentraciones de 10,20,40,60,80,100  $\text{ng mL}^{-1}$ , posteriormente estas soluciones fueron almacenadas en frascos ámbar bajo sistema de refrigeración a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Con la finalidad de poder realizar la elección de los ions tanto caracterizador e cuantificador de cada agrotóxico, fue inyectado al sistema LC MS-MS padrones analíticos a una concentración de  $10\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$  en la modalidad de (full scan), realizando varias inyecciones hasta lograr una buena selección de estos ions.

### **3.8.2. Soluciones analíticas en el extracto**

Para evaluar el efecto matriz fueron preparadas soluciones analíticas en el extracto. Para el preparo de la matriz fue utilizado una muestra de quinua producido bajo el sistema de producción orgánico proveniente de Bolivia. Fue realizado el proceso de extracción conforme lo especificado en el ítem 3.10.3.1. El extracto fue fortificado con la concentración correspondiente al punto de la curva analítica.

### **3.8.3. Soluciones analíticas en solvente**

La curva de calibración fue preparada a partir de la solución estoque preparada en un mix , de donde se preparó las concentraciones de los padrones para los puntos de la curva analítica fueron de 10, 20,40,60,80 y 100 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  para cada uno de los analitos respectivamente.

### **3.8.4. Fortificaciones de muestras de quinua**

Para poder evaluar la exactitud del método, fueron realizadas fortificaciones en 5 g muestras de quinua orgánica, usando para eso el mix padrón preparado, las fortificaciones fueron realizadas en 3 puntos de la curva de calibración 10, 50 y 100 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , con 3 repeticiones y inyectadas 3 veces en el sistema.

Luego del proceso de fortificación, las muestras de quinua orgánica fueron dejadas en reposo por el lapso de 30 minutos para posteriormente dar inicio al proceso de extracción conforme esta descrito en el ítem 3.10.3..

El porcentaje de recuperación en cada punto de fortificación fue evaluado usando la ecuación propuesta para este fin.

### **3.9. Análisis cromatográfico por LC MS-MS**

#### **3.9.1. Condiciones Cromatográficas**

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: columna Agilent eclipse plus C-18 3.0 x 100 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ , temperatura de la columna 40°C, fase móvil MeCN e H<sub>2</sub>O con 0,2% HCOOH tamponado con una solución de formiato de amonio 5 mmol L<sup>-1</sup>, flujo 0,6 mL min<sup>-1</sup>, gradiente de la fase móvil, tiempo (min) 0 = 40% ACN, 4 = 55%, 6 = 75%, 8 = 100 % e 10 = 100%; volumen de inyección de 10  $\mu\text{L}$ . Las condiciones del espectrómetro de masas: modo: ESI, nebulizador 40 psi, flujo del gas 10 L min<sup>-1</sup>, energía de fragmentación 70 – 120 V, energía de colisión 5-30 V, modo MRM (multiple reaction monitoring), tiempo total de corrida 10 min.

#### **3.9.2. Análisis cualitativo y cuantitativo**

Los análisis cualitativos y cuantitativos de los agrotóxicos fueron realizados utilizando el modo MRM.

Para esta etapa, trabajos de selección de ions para realizar el monitoramiento de los analitos objetivo de este estudio fueron realizados, donde fueron escogidos 2 ions uno calificador y el otro cuantificador, para este trabajo fueron inyectados los padrones analíticos en forma individual al sistema cromatográfico en el modo *scan* (barredura), para poder identificar el tiempo de retención y el perfil de fragmentación de los ions de cada compuesto y de esa manera escoger los ions de interés, cuyos resultados son listados en la Tabla VII.

### **3.10. Validación del método analítico**

#### **3.10.1. Determinación de la linealidad de las curvas analíticas**

La evaluación de la linealidad de las curvas analíticas fue evaluada utilizando las soluciones de los padrones analíticos preparados en las concentraciones descritas en el ítem 3.8.1. Siendo realizadas 3 inyecciones de cada uno de los analitos objetivos de este estudio.

#### **3.10.2. Determinación del LD y LC**

Los límites de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) para cada uno de los agrotóxicos; Metamidofos, Acepate, Monocrotofos, Tiametoxan, Imadoclopride, Atrazina, Azoxystrobin, Buprofezina, Carbofurano, Ciproconazol, Malation, Deltametrina, Difeconazole, Metribuzin, Monuron, Triazofos Clorpirifos, Metolacoloro. Fueron determinados usando los parámetros de la curva analítica (Ribani et al., 2004).

#### **3.10.3. Ensayos de extracción, fortificación y recuperación (%)**

Los ensayos de fortificación y recuperación tiene por objetivo evaluar la exactitud del método como un todo, una vez que se calcula la concentración real medida en el final de todo el procedimiento, en comparación con la concentración conocida inicialmente en la matriz, así a través de las recuperaciones obtenidas de los agrotóxicos analizados se puede evaluar la exactitud del método, y a través de los coeficiente de variación calculados se obtiene información sobre la repetitividad del método (precisión) de los datos obtenidos.

Este trabajo fue realizado, fortificando muestras de quinua orgánica en tres niveles de la curva analítica con 3 repeticiones, para posteriormente dar inicio con todo el proceso de extracción de los analitos utilizando el método QuEChERS.

### **3.10.3.1. Extracción**

El método de extracción empleado, fue desarrollado por Anastassiades et al., (2003).

1000 g de quinua orgánica en grano, fue previamente procesada (molida) para luego ser retirado una cantidad de 5 g para un frasco de 50 mL de teflón. Luego fue colocado 10 mL. de agua milli-Q a 4 °C, logrando así obtener una muestra consistente, posterior a esta etapa fue realizado la fortificación con la solución padrón mix utilizando para esto una micro jeringa a los niveles de 10, 50 y 100 ng.mL<sup>-1</sup>, las muestras fortificadas fueron dejadas en el recipiente abierto a temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos para lograr una buena interacción de las moléculas de los analitos con la matriz.

Seguidamente fue adicionado 10 mL de MeCN e agitado en el homogeneizador blender por el lapso de 2 minutos a 12.000 rpm, luego fue colocado 4.0 g de MgSO<sub>4</sub> anhidro y 1.0 g de NaCl, agitar vigorosamente por el lapso de 1 min., llevar a centrifuga por 5 min a una velocidad de 5000 rpm.

### **3.10.3.2. Clean-up dSPE**

Transferir una alícuota de 6 mL del sobrenadante para un frasco de 15 mL de teflón conteniendo 900 mg de MgSO<sub>4</sub> anhidro y 150 mg de adsorbente PSA y

agitar vigorosamente durante 1 minuto manualmente, llevar nuevamente a centrifuga a 5000 rpm por 5 minutos.

## **CAPITULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **4.1. Condiciones de análisis por LC MS-MS (modo MRM)**

Las condiciones cromatográficas fueron optimizadas para cada uno de los compuestos analizados, tomando en cuenta su respuesta cromatográfica a varios factores, temperatura de columna, concentración de las fases móviles, flujo del solvente, entre otros. Llegando a tener una buena respuesta cromatográfica de todos los compuestos monitoreados.

Los ions seleccionados para cada analito se encuentran en la Tabla VII.

**TABLA VII. CARACTERÍSTICAS DE LONS MONITOREADOS EN EL  
ESPECTRÓMETRO DE MASAS**

Analito	Ion Precursor	Ion Producto	Energía (V) Fragmentación	Energía de colisión (V)
Acefate	184	142.9	70	5
Acefate	184	125	70	5
Atrazina	216	174	100	20
Atrazina	216	132	120	20
Azoxistrobim	403.8	403.8	135	0
Azoxistrobim	403.8	344	135	15
Buprofezin	306	201	70	10
Buprofezin	306	116	90	10
Carbofurano	222	165	100	10
Carbofurano	222	123	100	10
Ciproconazol	292	125	135	20
Ciproconazol	292	70	135	20
Clorpirifos	349.9	97	90	32
Deltametrina	506	280.8	80	5
Deltametrina	506	91	80	77
Difeconazole	406	251	70	5
Diuron	233	160	120	30
Diuron	233	72	70	5
Imidaclopride	256	208.9	90	9
Imidaclopride	256	175	90	13
Malation	331	99	70	5
Metamidofos	142	124.8	80	8
Metamidofos	142	93.9	80	8
Metolaclo	284	252.2	100	15
Metolaclo	284	176.3	100	15
Metribuzin	215	187	70	5
Metribuzin	215	131	120	30
Monocrotofos	224.2	192.9	80	0
Monocrotofos	224	126.9	80	8
Monuron	199	126	120	30
Monuron	199	72	70	5
Tiametoxam	292	211	70	5
Tiametoxam	292	181	120	30
Triazofos	314	162	90	15
Triazofos	314	119	90	30

Fuente: elaboración propia.

Durante el análisis por cromatografía líquida, fue utilizado un sistema de HPLC Agilent 1200 con una bomba binaria acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadropolo Agilent 6410, las condiciones cromatográficas son: columna Agilent eclipse plus C-18 3.0 x 100 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ , temperatura de la columna 40° C, fase móvil ACN e H<sub>2</sub>O con 0,1% HCOOH, flujo 0,6 mL min<sup>-1</sup>, gradiente de fase móvil, tiempo (min) 0 = 40% ACN, 4 = 55 %, 6 = 75%, 8 = 100% e 10 = 100%; volumen de inyección de 10  $\mu\text{L}$ . Las condiciones de espectrómetro de masas: modo: ESI, nebulizador 40 psi, flujo del gas 10 L min<sup>-1</sup>, energía de fragmentación 70 – 120 V, energía de colisión 5-30 V, modo MRM, tiempo total de corrida 10 min.

#### **4.2. Validación del método analítico**

Todos los padrones analíticos empleados para la realización de este estudio fueron preparados en (solvente acetonitrilo grado HPLC) y también fue usado en la preparación del blanco de la matriz. Así fue posible evaluar el efecto de la presencia de extracto en la matriz que podría influenciar a los resultados, dependiendo de los compuestos y de la técnica cromatográfica empleada.

##### **4.2.1. Selectividad**

La matriz analizada, podría contener componentes que puedan interferir en el desempeño de la identificación y cuantificación de los analitos objetivo del estudio; que pueden aumentar o disminuir la señal visualizada en el cromatógrafo, con la finalidad de poder evaluar este efecto llamado efecto matriz, se realizó una comparación entre las concentraciones de algunos analitos en el solvente y aplicados en la matriz, no existiendo evidencia estadística mínima significativa a un nivel de 0.5% que pueda probar la existencia de este efecto.

**TABLA VIII. PRUEBA SIGNIFICATIVA DE (T) 95% PARA EVALUAR EFECTO MATRIZ.**

Analitos	Valor de t(calculado)	Valor t(tab)
		G.L 14( 0.05 %)
Acefato	-0.172	2.145
Tiametoxan	-0.003	2.145
Monuron	-0.027	2.145
Metribuzin	-0.165	2.145
Carbofurano	-0.093	2.145
Atrazina	-0.113	2.145
Azoxistrobim	-0.049	2.145
Malation	-0.087	2.145
Triazofos	-0.026	2.145
Buprofezin	-0.108	2.145
Difeconazole	-0.059	2.145
Clorpirifos	-0.101	2.145

Fuente. Elaboración propia.

Según las características químicas y nutritivas descritas por (Mujica, 2001; Respo, 2003, y Jubet, 2009). Se pudo apreciar que dichas características no tienen influencia en la aplicación del método analítico evaluado. Por el contrario, en un estudio realizado por (Cunha et al, 2009). Evaluó el efecto de 3 matrices (uvas, mostos e vinos) en la aplicación del método QuEChERS observando la aparición del efecto matriz durante el análisis debido principalmente a factores tales como alto contenido de azúcares y alcohol. Para este estudio, las concentraciones principalmente proteicas, contenido de saponina, y de grasas que tiene la quinua no interfirió en la identificación y posterior cuantificación de los agrotóxicos analizados. Macromoléculas que fueron perfectamente separadas y retiradas de las muestras mediante el proceso de *clean up*, con lo que pudimos

apreciar que el mencionado efecto matriz no interfirió significativamente en los análisis realizados.

#### 4.2.2. Linealidad

Analizando los resultados mostrados en la Tabla IX, se aprecia que todos los compuestos presentan un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) entre  $0.992 \pm 0.001$ , lo que garantiza que las respuestas cromatográficas sean más estables y los análisis más sensibles, proporcionando así respuestas más precisas.

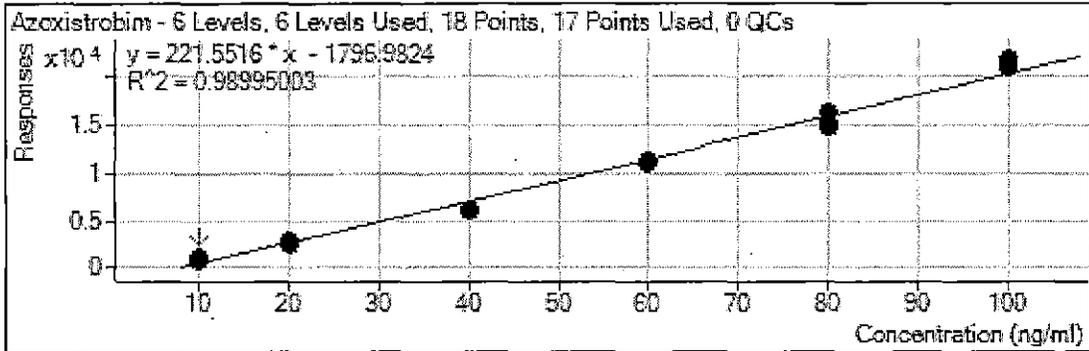
**TABLA IX RESPUESTAS CROMATOGRÁFICAS EN SOLVENTE**

Compuesto	Linealidad ( $R^2$ )	TRR (Lim conf 95%)
Metamidofos	0.9911	0.823±0.002
Acefate	0.9919	0.827±0.003
Tiametoxam	0.9923	1.069±0.013
Imidaclopride	0.9936	1.322±0.026
Monuron	0.9903	2.192±0.070
Metribuzin	0.9920	2.705±0.072
Carbofurano	0.9905	3.003±0.077
Atrazina	0.9900	3.592±0.064
Ciproconazol	0.9903	5.052±0.027
Azoxistrobim	0.9906	5.318±0.016
Malation	0.9957	5.661±0.012
Triazofos	0.9910	5.679±0.013
Metolacoloro	0.9913	5.746±0.013
Difeconazole	0.9929	6.017±0.011
Clorpirifos	0.9908	7.465±0.010
Buprofezin	0.9952	7.683±0.013

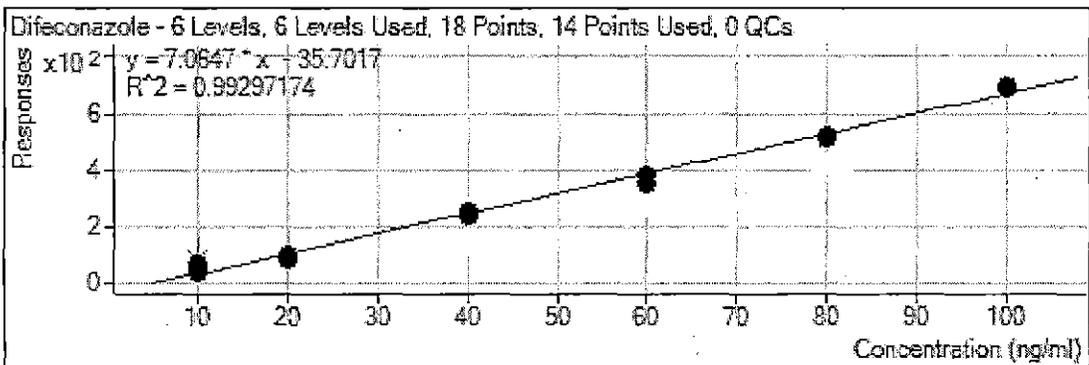
Fuente: Elaboración propia.

(Kovalczuk et al., 2007), en un análisis de tiodicarp, tiophanate-metil, tolyfluanid, triamidedon, triamidenol, triflumuron y triforine obtuvo un ( $R^2$ ) de  $0.949 \pm 0.0064$ ; (Lehotay, 2007) realizando la determinación de residuos de 20 pesticidas en alimentos obtuvo un ( $R^2$ ) 0.99; (Moreno et al., 2008), analizando

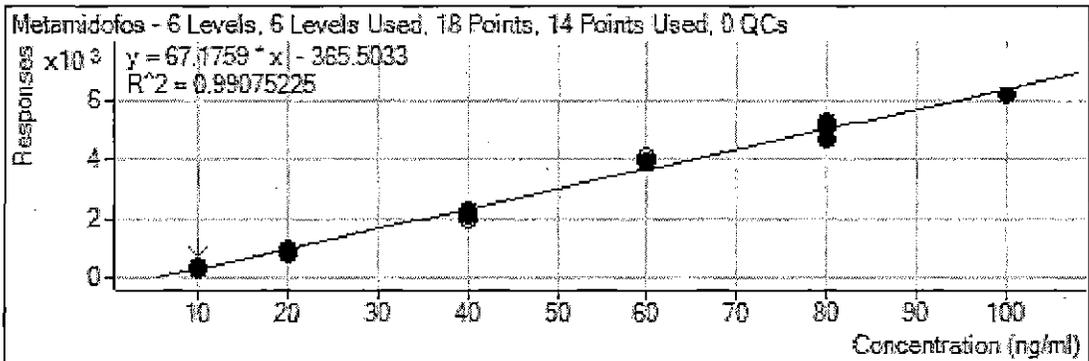
residuos de más de 140 pesticidas en alimentos por cromatografía a gas obtuvo un ( $R^2$ ) mayores a 0.9920 y 0.9924; (Koesukwiwat et al., 2010), usó el método QueChERS para realizar el análisis de 150 pesticidas en frutas y vegetales obtuvo valores de  $R^2 \geq 0.995$  y  $R^2 \geq 0.990$ . Se aprecia que los resultados obtenidos en el análisis realizado en la matriz quinua, la cual es totalmente diferente a las otras matrices analizadas, se encuentra dentro de los estándares aceptables en comparación con otras investigaciones. Podría deberse a los cuidados tomados en cuenta al momento de realizar la preparación de los padrones analíticos, tratando de evitar en todo momento los errores sistemáticos a los cuales están expuesto estos tipos de estudios, ya que los análisis fueron conducidos en un laboratorio que está acreditado con la norma ISO 17025; por otro lado la alta sensibilidad debido al altísimo nivel de complejidad del espectrómetro de masas permitió la obtención de estos valores. A continuación son presentados los gráficos de los  $R^2$  de cada uno de los compuestos analizados



**Gráfico 1. Curva de calibración del compuesto Azoxistrobin.**



**Gráfico 2. Curva de calibración del compuesto Difeconazole**



**Gráfico 3. Curva de calibración del compuesto Metamidofos**

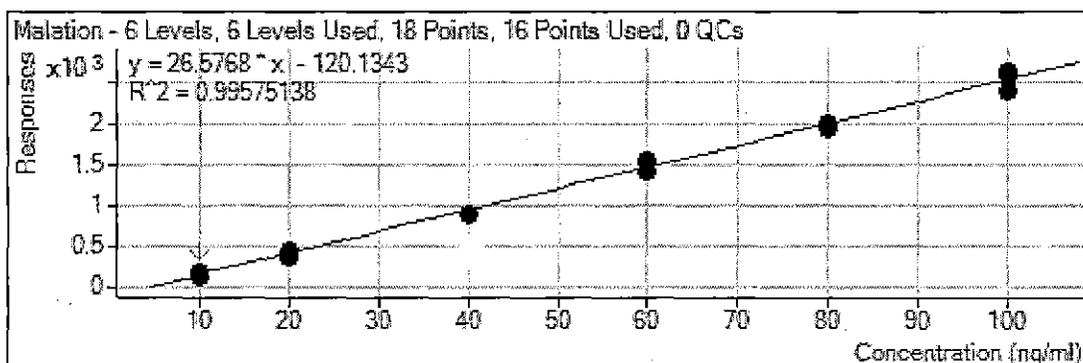


Gráfico 4. Curva de calibración del compuesto Malation

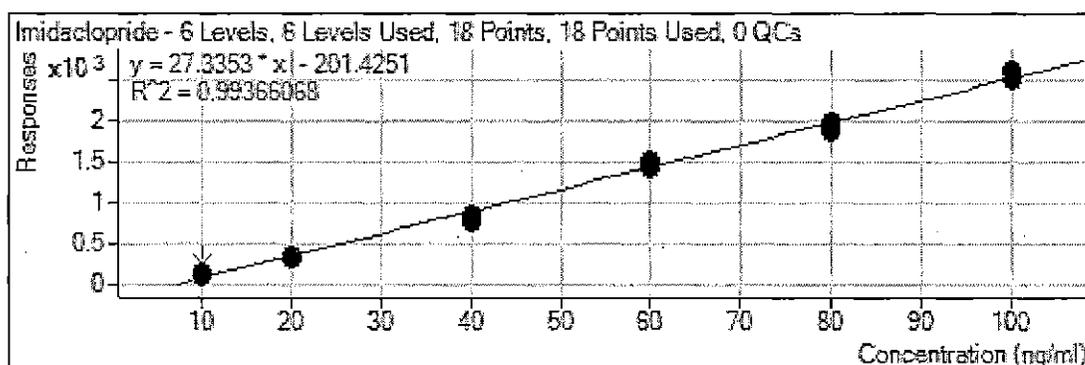


Gráfico 5. Curva de calibración del compuesto Imidaclopride.

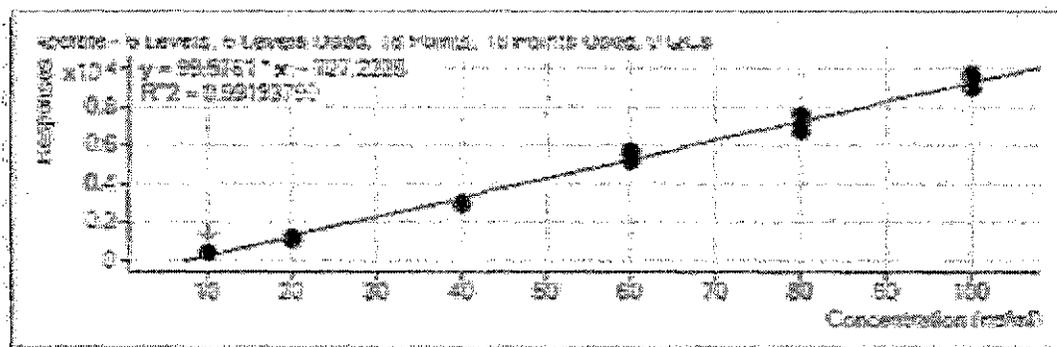


Gráfico 6. Curva de calibración del compuesto Acefate.

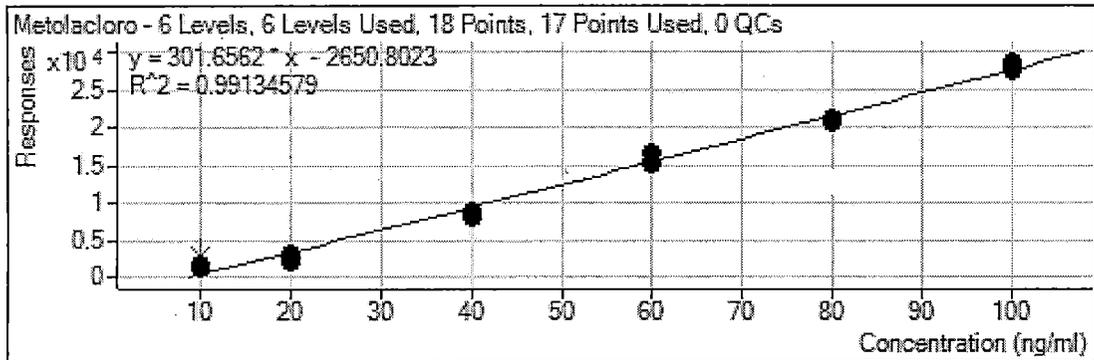


Grafico 7. Curva de calibración del compuesto Metolaclo.

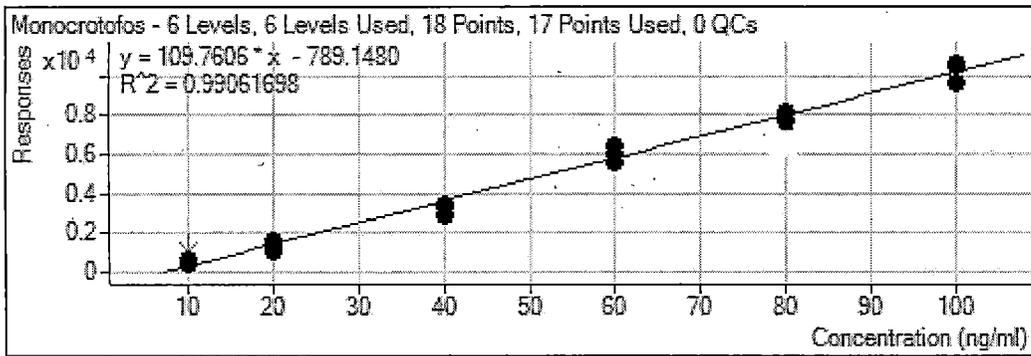


Grafico 8. Curva de calibración del compuesto Monocrotofos.

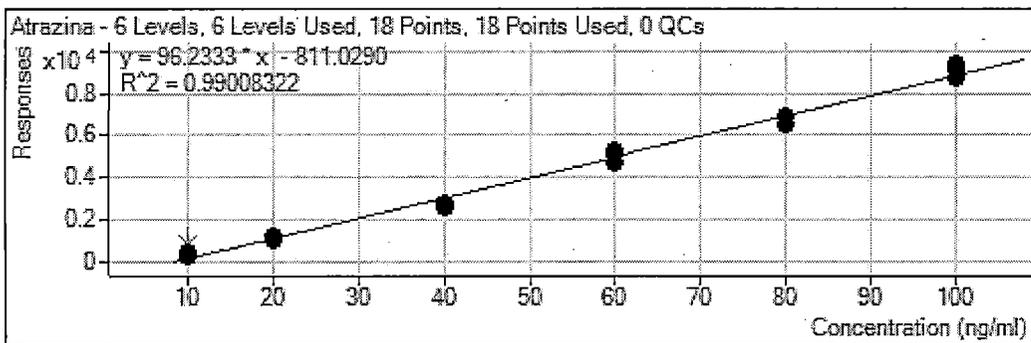


Grafico 9. Curva de calibración del compuesto Atrazina

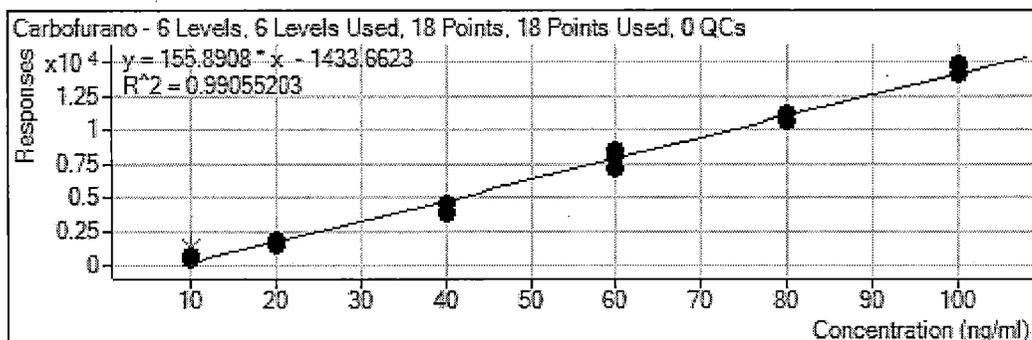


Gráfico 10. Curva de calibración del compuesto Carbofurano.

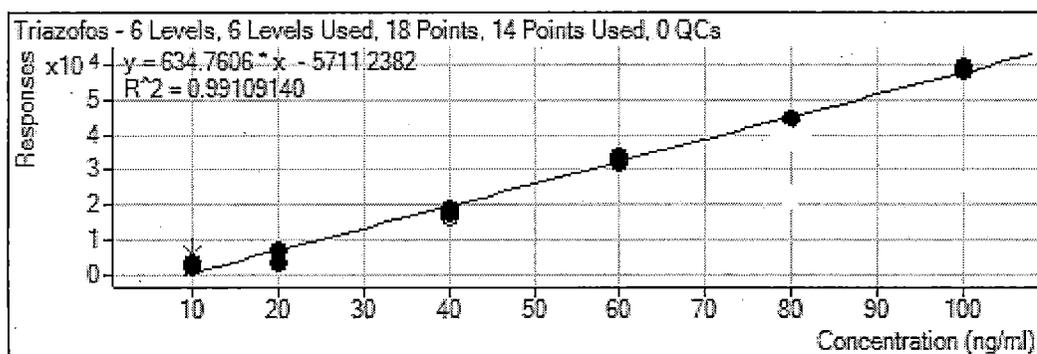


Gráfico 11. Curva de calibración para el compuesto Triazofos.

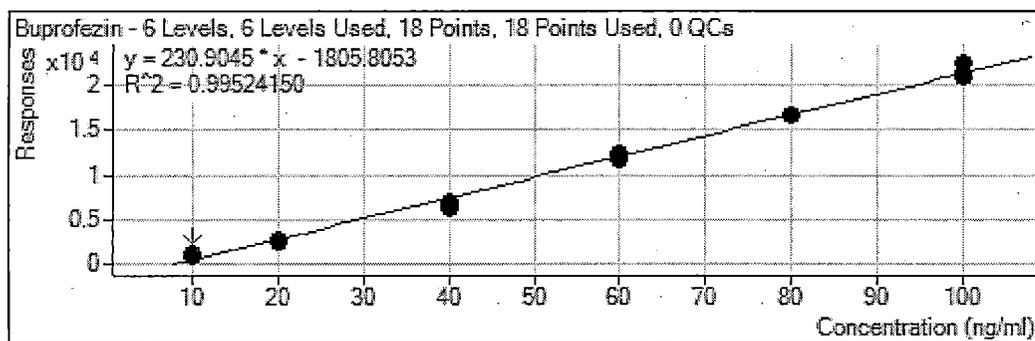


Gráfico 12. Curva de calibración para el compuesto Buprofezin.

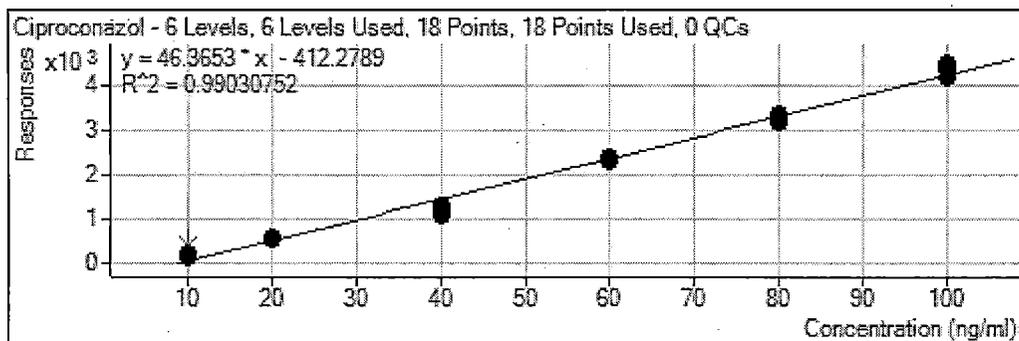


Grafico 13. Curva de calibración para el compuesto Ciproconazol.

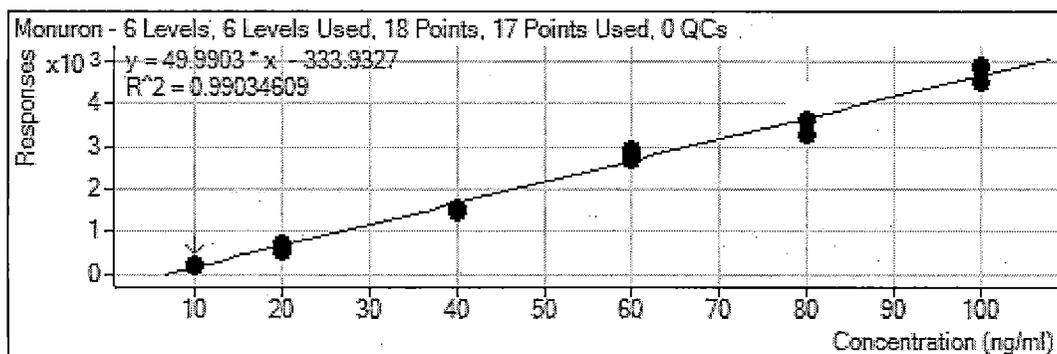
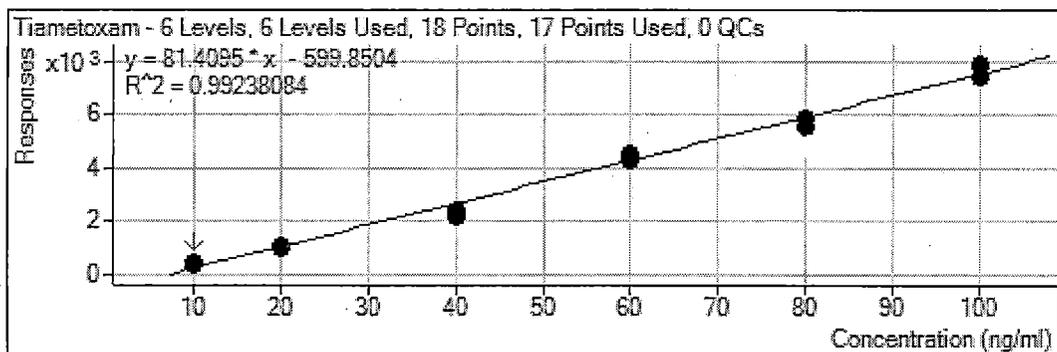
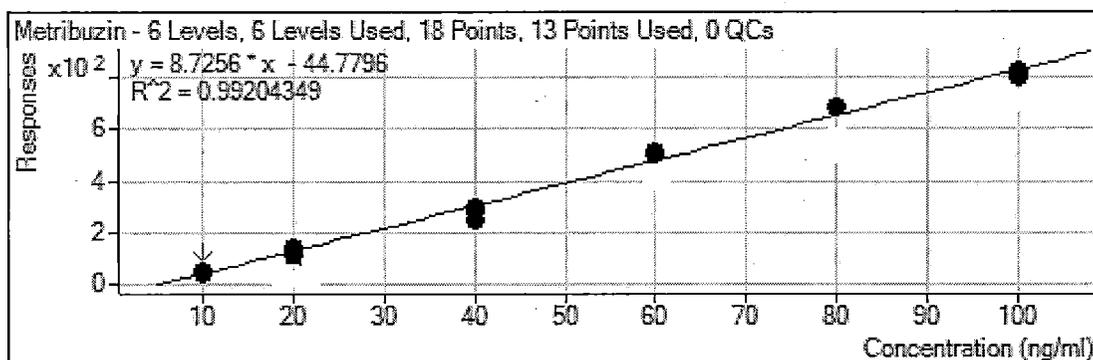


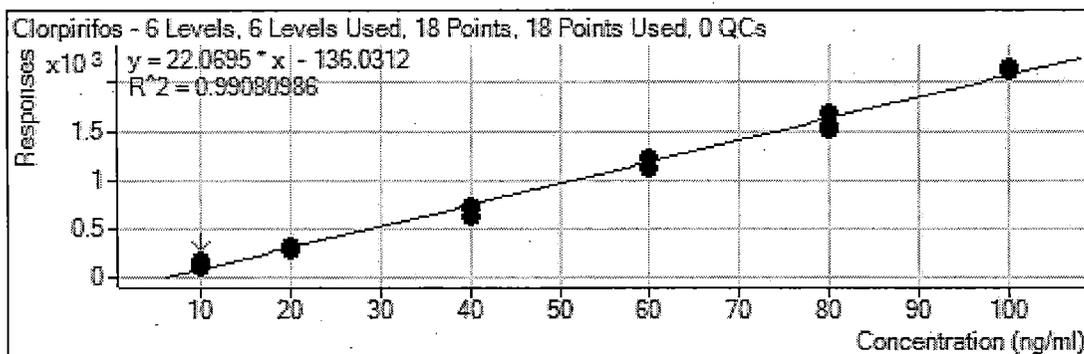
Gráfico 14. Curva de calibración para el compuesto Monuron



**Gráfico 15. Curva de calibración para el compuesto Tiametoxan**



**Gráfico 16. Curva de calibración para el compuesto Metribuzin**



**Gráfico 17. Curva de calibración para el compuesto Clorpirifos.**

#### 4.2.3. Determinación de los valores de límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).

Realizada la preparación de los padrones analíticos e inyectados en el LC MS-MS, en las concentraciones de 10,20,40,60,80,100 ng.mL<sup>-1</sup> fue realizado el estudio de linealidad mostrado en el ítem (4.2.2), para la realización de los cálculos de LD y LC fueron considerados parámetros de la ecuación de la curva de calibración, para lo cual fue considerado la inclinación de la recta,

conjuntamente con la desviación estándar del ruido generado por el LC MS-MS realizándose 7 inyecciones de blancos con matriz. Resultados que son presentado en la tabla X

**Tabla X cálculo del límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).**

Nº	Compuesto	Inclina.curva	SD Ruido	LD (ng mL <sup>-1</sup> )	LC (ng mL <sup>-1</sup> )
1	Metamidofos	61.1759	0.9	0.049	0.147
2	Acefate	99.5721	0.9	0.030	0.090
3	Monocrotofos	109.7606	0.9	0.027	0.082
4	Tiametoxam	81.4095	0.9	0.036	0.111
5	Imidaclopride	27.3353	0.9	0.109	0.329
6	Monuron	49.9903	0.9	0.059	0.180
7	Metribuzin	8.7256	0.9	0.340	1.031
8	Carbofurano	155.8908	0.9	0.019	0.058
9	Atrazina	96.2333	0.9	0.031	0.094
10	Ciproconazol	46.3653	0.9	0.064	0.194
11	Azoxistrobim	221.5516	0.9	0.013	0.041
12	Malation	26.5768	0.9	0.112	0.339
13	Triazofos	634.7606	0.9	0.005	0.014
14	Metolacoloro	301.6562	0.9	0.010	0.030
15	Difeconazole	7.0647	0.9	0.420	1.274
16	Clorpirifos	22.0695	0.9	0.135	0.408
17	Buprofezin	230.9045	0.9	0.013	0.039

Fuente: Elaboración propia.

Jian et al., (2009), validando el método QuEChERS para 77 pesticidas usando cromatografía a gas, reporta límites de cuantificación entre 0.004 y 0.05 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente para los pesticidas analizados, logrando bajos niveles de cuantificación. En otra investigación realizada en la Republica Czech por Kovalczuk et al., (2007), manifiestan la novedad de este sistema rápido, para la determinación de múltiples residuos de pesticidas usando UPLC MS-MS, lograron límites de cuantificación menores a 10 µg Kg<sup>-1</sup> para un total de 64 pesticidas. Resultados similares fueron encontrados por Moreno et al., (2008). Koesukwiwat

et al., (2010); Lehotay et al., (2010) reportan límites de detección que pueden ser cuantificados hasta una concentración  $10 \text{ ng.g}^{-1}$ , manifestando también que dichos valores dependen de la matriz y el método en estudio.

Otro aspecto que sin duda alguna puede interferir el logro de estos límites de detección, es el tipo de equipamiento utilizado en cada unos de estos trabajos, podemos ver que, de los primeros métodos cromatográficos desarrollados, fue la cromatografía líquida, Lanças (2009), sin embargo la cromatografía a gas tuvo un desarrollo mayor en los últimos años con el uso de espectrómetros de masas que permitían obtener mejores informaciones con un nivel alto de sensibilidad en los análisis desarrollados, luego del descubrimiento de la posibilidad del acoplamiento de la cromatografía líquida a un espectrómetro de masas, fue realizado gracias al desarrollo de la fuente de ionización a presión atmosférica, lográndose así un grande avance en el desarrollo de aparatos cada vez más sensibles y de alta resolución. Podemos apreciar que el método cubre las expectativas analíticas en comparación con resultados obtenidos por otros investigadores y cubre las expectativas de sensibilidad para el tipo de equipamiento utilizado en la investigación.

#### **4.2.4. Precisión**

Este parámetro fue analizado, realizando fortificaciones con padrones analíticos en concentraciones conocidas  $10, 50$  y  $100 \text{ ng.mL}^{-1}$ , posteriormente luego de esperar media hora después de haber aplicado el padrón a la matriz, se dio inicio al proceso de extracción obteniéndose los siguientes datos presentados en el Tabla XI

TABLA XI. PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN

Compuesto	% Recuperación		
	10 ng mL <sup>-1</sup>	50 ng mL <sup>-1</sup>	100 ng mL <sup>-1</sup>
Metamidofos	96.89	51.49	40.67
Acefate	100.63	52.10	41.09
Tiametoxam	154.89	117.01	102.61
Imidaclopride	163.47	126.74	110.52
Monuron	182.61	136.30	119.15
Metribuzin	154.65	156.23	141.10
Carbofurano	108.36	37.57	25.25
Atrazina	87.78	18.37	10.48
Ciproconazol	166.68	119.17	112.00
Azoxistrobim	153.83	109.51	98.84
Malation	139.11	112.15	115.22
Triazofos	169.20	114.59	100.09
Metolacoloro	161.96	107.77	95.77
Difeconazole	157.99	134.56	125.32
Clorpirifos	127.72	81.03	88.87
Buprofezin	135.98	90.50	80.15

Fuente: Elaboración propia.

Existe un porcentaje de recuperación  $151.44 \pm 12.797$  % con una desviación estándar de 0.1 para la concentración de  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ ;  $112.127 \pm 15.987$  %, desviación estándar de 0.2 para la concentración de  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  y  $102.305 \pm 14.726$  % con una desviación estándar de 0.2 respectivamente para la concentración de  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ , estos cálculos fueron realizados sin tomar en consideración las recuperaciones obtenidas en los compuestos metamidofos, carbofurano y atrazina ya que en la mayoría de ellos el porcentaje de recuperación fue muy bajo. Lo que podría indicar que posiblemente fueron retenidos, o parcialmente degradados durante la realización del método.

Dentro de los criterios establecidos por la Unión Europea para la validación de métodos analíticos empleados para análisis de residuos de agrotóxicos en

alimentos, el porcentaje de recuperación aceptable para los métodos multiresíduos debe ser entre 70 y 120% y el coeficiente de variación no debe exceder de 20% (European Commision, 2007)

Los valores de recuperación fueron calculados utilizando las curvas de calibración analíticas para cada uno de los compuestos. En la tabla XI son presentados las medias de los resultados de las recuperaciones obtenidas (n=3) en muestras de quinua orgánica en los niveles de 10, 50 y 100 ng.mL<sup>-1</sup> extraídos por el método QuEChERS y analizados por LC MS/MS modo MRM

### 4.3. Determinación de agrotóxicos en muestras de quinua.

**TABLA XII. RESULTADOS DE CONTENIDO DE LOS AGROTÓXICOS (HERBICIDAS Y DE ACCIÓN MÚLTIPLE) EN MUESTRAS DE QUINUA EXPRESADOS EN  $\mu\text{g kg}^{-1}$**

CONTENIDO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EN MUESTRAS DE QUINUA EXPRESADOS EN $\mu\text{g kg}^{-1}$									
Muestra	HERVICIDAS				ACCIÓN MÚLTIPLE (insecticida, acaricida, nematicida)				
	Monuron	Metribuzin	Atrazina	Metolacloro	Carbofurano	Malation	Triazofos	Buprofezin	Metamidofos
03-20-006		10.979±1.437		8.746±1.166		6.232±2.839	8.819±0.834		
03-20-293				8,906±0,406		5,838±1,732	8,755±1,168		
03-08-980				8,994±0,319		6,557±3,030	9,005±0,555	7,804±0,163	
03-20-106		4,756±1,026		9,018±0,193		6,161±1,552	9,469±1,900	7,857±1,512	
03-08-228		7,455±1,108		9,540±0,470	8,869±0,715	13,336±2,437	9,195±0,563	7,923±0,0135	6,983±0,041
03-20-886	7,388±1,742	7,388±1,742		9,276±0,641		6,316±2,152	8,795±0,967	7,365±2,193	7,451±1,920
03-20-020				9,105±0,060		6,032±1,632	9,028±0,002		6,725±2,440
03-20-223	7,614±0,350			9,036±0,192		6,619±2,795	8,789±0,933	7,930±0,08	6,725±2,440
03-20-320				9,108±0,470		6,257±1,99	8,968±0,273	7,879±0,13	6,873±1,145
03-20-885				9,217±0,315		5,940±1,344	9,018±0,010	8,042±0,654	
03-20-267				9,198±0,426		6,406±1,799	8,466±2,398		
03-08-776				9,150±0,521		5,605±0,103		8,008±0,536	
03-03-991	7,285±0,956			9,387±0,740		6,933±0,905		7,879±0,018	
03-20-211	7,331±2,131	6,816±2,324		9,347±0,425		7,439±1,755		7,380±2,314	
03-20-879				9,267±0,559		6,927±0,872		7,915±0,02	

02-20-216				9,158±0,254		9,107±1,965	8,899±0,615	7,411±1,874	
03-20-948		6,678±2,928		9,369±0,380	9,155±0,463	6,969±2,001			
03-20-168	7,461±0,202			9,273±0,387		10,140±1,311	9,016±0,110	7,403±1,92	
03-20-106		5,877±1,549		8,635±2,876		6,310±2,636	8,697±1,445	7,456±1,816	
03-20-796		5,885±0,707		9,362±0,224		8,070±1,237	9,325±1,117	7,896±0,084	
03-20-980				9,387±1,574		6,406±1,864			
AIRAMPO	6,814±1,540			7,906±0,,256					
03-20-036		6,587±1,108		8,205±1,06		6,257±1,99			
03-08-661	7,285±0,956			8,036±0,192		5,940±1,344		7,879±0,018	5,255±2,44

Fuente. Elaboración propia.

**TABLA XIII. RESULTADOS DE CONTENIDO DE LOS AGROTÓXICOS (FUNGICIDAS Y DE INSECTICIDAS) EN MUESTRAS DE QUINUA EXPRESADOS EN  $\mu\text{G KG}^{-1}$**

CONTENIDO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EN MUESTRAS DE QUINUA EXPRESADOS EN $\mu\text{g kg}^{-1}$								
Muestra	FUNGICIDAS			INSECTICIDAS				
	Ciproconazol	Azoxistrobim	Difeconazole	Deltametrina	Clorpirifos	Tiametoxam	Imidaclopride	Acefate
03-20-006		8,861±0,881			6,192±0,856			7,463±0,020
03-20-293					60086±1,714	7,264±0,811	7,900±1,436	6,884±1,236
03-08-980					6,487±0,167			
03-20-106					6,476±1,164	6,853±1,108		7,026±1,563
03-08-228	7,869±0,669	8,651±0,295	5,487±1,989		7,705±1,027			
03-20-886		8,927±0,246			7,642±0,343	6,574±1,55	8,729±0,766	9,144±1,783
03-20-020	6,528±2,756	9,154±0,341			6,848±1,107			7,476±2,303
03-20-223		8,977±0,427			6,969±0,425		9,352±0,163	8,851±2,053
03-20-320		9,001±1,196			7,381±1,35		10,009±1,505	
03-20-885		8,776±0,463			6,916±0,621		8,235±0,447	8,882±1,510
03-20-267		8,711±0,0189			6,840±0,809		9,700±0,667	
03-08-776		8,849±0,419			7,202±1,023			
03-03-991		11,020±2,298			6,681±0,642	7,460±1,197	7,159±1,289	7,843±1,600
03-20-211		8,215±1,471			6,654±0,28	7,108±0,075	7,726±0,822	
03-20-879					7,845±0,851	7,612±1,330		7,545±0,058
02-20-216					7,611±1,454	6,931±0,882	7,690±0,227	7,309±1,102
03-20-948					7,745±1,577	6,988±0,976		
03-20-168					7,421±2,016	7,088±0,292		7,402±0,657
03-20-106					7,595±1,589	7,050±0,395		7,309±0,721
03-20-796					7,713±1,944			7,406±0,370

03-20-980		8,687±0,895			6,969±1,234	7,578±1,58		6,884±1,874
AIRAMPO					5,641±0,567		8,352±1,780	9,144±0,983
03-20-036		7,857±1,457			6,654±0,28	7,931±0,982		6,843±1,587
03-08-661		6,711±0,019			7,611±1,454			5,458±1,303

Fuente: Elaboración propia.

Fueron analizadas 25 muestras de quinua, de los cuales 24 muestras fueron utilizadas para ser cuantificadas y calificadas, una muestra de Bolivia proveniente de un sistema de producción orgánico fue utilizado para evaluar el método analítico.

Todas las muestras analizadas contienen residuos de pesticidas monitoreados en este experimento, a nivel de  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , en ninguna de las 24 muestras analizadas fue encontrado residuos de atrazina y deltametrina, ya en el caso de la atrazina, que es un herbicida pre emergente; en la actualidad no se cuenta con estudios que confirmen que exposiciones a este compuesto puedan originar cáncer en seres humanos, pero no obstante según un estudio publicado por la (Universidad de Cornell, 1999), manifiesta que existen grandes evidencias que este compuesto genera un tipo de cáncer en seres humanos. Pero su impacto en el medio ambiente está siendo estudiado ampliamente, es así que en un estudio realizado por (Oka., et al 2008), demostró que concentraciones bajas de atrazina (0.1 a 100 ppb) ocasionan trastornos sexuales en ranas, por otro lado podemos ver que el uso de este compuesto es totalmente prohibido en la Unión Europea desde del año 2004. (REGLAMENTO (UE) N o 196/2010).

Todas las muestras analizadas contenían residuos de por lo menos 5 agrotóxicos, los resultados más relevantes quedaron por cuenta del Acefato, que presentó residuos entre 5,605 y 10,140  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , Azosxytrobin con valores entre 6,711 y 11,020  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , Malation entre 5,605 y 10,140  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , Metolacloro con valores entre 7,403 y 8,042  $\mu\text{g kg}^{-1}$  y Triazofos que contenía residuos entre 8,466 y 9,325  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . No existe registro de ningún agrotóxico en la legislación peruana y ni en el Codex Alimentarius para esta matriz, lo que impide establecer una correlación de estos resultados

Llama la atención esta amplia gama de residuos encontrados en este cultivo, ya que según la mayoría de los investigadores en quinua citados en este

trabajo, manifiestan que la gran parte de las áreas de este cultivo, son conducidas bajo un sistema de producción orgánico, lo que está siendo totalmente demostrado que no es así debido a los resultados obtenidos, por otro lado la gran facilidad para la adquisición de estos productos en las tiendas agropecuarias, y muchas veces en las ferias campesinas que son realizadas los fines de semana, conducen a los productores a comprar cualquier tipo de producto con la finalidad de dar una solución a problemas fitosanitarios que se presenta en el campo, sin tener una orientación técnica paa este problema.

Tratándose de la quinua ser un producto con un gran potencial de exportación, este método de análisis se muestra altamente propicio para la identificación e cuantificación de los agrotóxicos monitoreados. Análisis que pueden ser realizados con una pequeña cantidad de muestra y de forma rápida y altamente confiable.

## CONCLUSIONES

PRIMERO.- Los análisis realizados revelan ventajas, como: rapidez, simplicidad, confiabilidad, robustez, bajo consumo de solventes orgánicos, utilización de poco material de vidrio, y pudo observarse buenos resultados para los agrotóxicos extraídos.

SEGUNDO.- El método fue eficiente para el análisis de los agrotóxicos: Metamidofos, Acepate, Monocrotofos, Tiametoxan, Imadoclopride, Atrazina, Azoxystrobin, Buprofezina, Carbofurano, Ciproconazol, Malation, Deltametrina, Difeconazole, Metribuzin, Monuron, , Triazofos Clorpirifos, Metolacoloro.

TERCERO.- Bajo las condiciones analíticas los compuestos: metamidophos, carbofurano y atrazina mostraron bajas tasas de recuperación por el método analítico, pudiendo haber quedado retenidos durante el proceso de extracción.

CUARTO.- Esta matriz no mostro suficiente diferencia estadística significativa que evidencie la interferencia de la matriz durante La caracterización y cuantificación de los agrotóxicos monitoreados por el método analítico, lo que demuestra su total aplicabilidad en esta matriz.

QUINTO.- Este estudio demuestra que el método de extracción para preparación de muestras QuEChERS, con extracción en fase sólida dispersiva, tiene potencial para su aplicación en análisis de rutina de multiresiduos de quinua

## RECOMENDACIONES

PRIMERO.- Realizar estudios de movilidad de los agrotóxicos Acephate, Azoxystrobin, Malation dentro de la planta de quinua con el uso de molécula marcada con C14; con la finalidad de poder conocer su distribución real después de una aplicación de este producto.

SEGUNDO.- Establecer conjuntamente con el Servicio Nacional de Sanidad Agraria SENASA Perú, una lista de productos que pueden ser aplicados a este cultivo con fines de exportación.

TERCERO.- Continuar con las investigaciones de residuos de pesticidas en esta matriz, con la finalidad de establecer los LMRs.

## REFERENCIAS

Araujo, A.C.P.; Nogueira, D.P.; Augusto, L.G.S. (2000). Impacto dos praguicidas na saúde: estudo da cultura do tomate. Revista de saúde Pública, São Paulo, v. 34, n. 3, p.309-313.

Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F.J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. Journal of AOAC International, Arlington, v.86, n.2. p.412-431.

Anastassiades, M. and Scherbaum, E.(2005). Sample handling and clean-up procedures. II New developments. In: Fernandez-Alba, A.R. (Ed). Chromatographic-mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residues. Amsterdam: Elsevier. Cap. 4, p. 113-233. (Comprehensive analytical chemistry, 43).

Aguera, A. and Kok, A.(2005). GC-MS. II: Applications for pesticide analysis in food. In: FERNANDEZ-ALBA, A.R. (Ed.). Chromatographic-mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residues. Amsterdam: Elsevier. cap.7, p.339-368. (Comprehensive analytical Chemistry, 43).

Alves Filho, J.P. (2002). Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos. São Paulo: Annablume. 188p.

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

Arrebola, F.J.; Martínez Vidal, J.L.; Mateu-Sánchez, M.; Álvarezcastellón, F.J. (2003). Determination of 81 multiclass pesticides in fresh foodstuffs by a single injection analysis using gas chromatography–chemical ionization and electron ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v.484, p.167–180.

Barrigossi, J.A.F. (2006). Cultivo do arroz de terras altas no estado de Mato Grosso. Normas Gerais sobre Uso de Agrotóxicos, Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. (Sistema de Produção 7). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozTerrasAltasMatoGrosso/referencias.htm> Acesso el día 1 de marzo de 2010.

Barrionuevo, W.R. and Lanças, F.M. (2001). Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. *Química Nova*, São Paulo, v.24, n.2, p.172-175.

Buldini, P.L.; Ricci, L.; Sharma, J.L. (2002). Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v.975, n.1, p.47-70.

BRASIL. (2003). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, 29 de maio: Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. *Diário Oficial da União; Poder Executivo*, Brasília, de 02 de junho de 2003. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br>

/leisref/public/showAct.php?id=15132&word>. Acesso: 10 marzo. 2010.

Cella, A.L. (2002). Ocorrência de agrotóxicos organofosforados e do organoclorados dicofol em maçãs (*Malus domestica*) 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Cunha, S.C; Fernandes, J.O; Alves, A; Oliveira, M.B.P.P. (2009). Fast low-pressure gás chromatography-mass spectrometry method for the determination of multiple pesticides in grapes, musts and wines. Journal of Chromatography A, 1216 pag 119-126.

D.S. 016-2000-AG, 2000. Reglamento de Registro Control y Comercialización de Plaguicidas Químicos de Uso Agrícola

Decreto Supremo Nº 037-91-AG, 1991. Prohibición total de Aldrin, Endrin, Dieldrin, BHC/HCH, Heptacloro, Canfecloro/Toxafeno, 2,4,5-T y DDT, así como de los derivados y compuestos que con ellos se puedan formular. Restricción de los plaguicidas Arsenicales sólo para ser usados en el cultivo del algodón.

Díez, C.; Traag, W.A.; Zommer, P.; Marineiro, P.; Atienza, J. (2006). Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solidphase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. Journal of Chromatography A, Amsterdam, v.1131, p.11-23,

Dórea, H.S and Lanças, F.M. (1999). Matrix solid-phase dispersion extraction of organophosphorus and synthetic pyrethroid pesticides in cashew nut and passion fruit. *Journal of Microcolumn Separations*, Provo, v.11, n.5, p.367-375.

Pesticides and Breast Cancer Risk: Atrazine 1999. Disponible en <http://envirocancer.cornell.edu/Factsheet/Pesticide/fs23.atrazine.cfm> acceso 1 de junio 2010.

EMBRAPA. Cultivo do tomate para industrialização. Gama: Embrapa Hortaliças,(2003). (Sistemas de Produção. Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial/index.htm>>. Acesso el 1 mar. 2010.

EUROPEAN COMMISSION. Directorate General Health and Consumer Protection. SANCO/2007/3131: (2007). Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Brussels, 35p.

Erney, D.R.; Gillespie, A.M.; Gilvydis, D.M.; Poole, C.F (1993). Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v.638, p.57-63.

FAO. Production. FAOSTAT, (2009). Disponible en:

<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> Acceso el día 27 feb 2010.

FAO. (2002). International code of conduct on the distribution and use of pesticides. Rome, disponible en:

<http://www.fao.org/DOCREP/005/Y4544E/y4544e00.htm>. Acceso el día 27 de feb 2010.

Frenich, A.G.; Bolaños, P.P.; Vidal, J.L.M. (2007). Multiresidue analysis of pesticides in animal liver by gas chromatography using triple quadrupole tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, Amsterdam, v.1153, n.1-2, p.194-202

Godoy, R.C.B. and Oliveira, M.I. (2004) Agrotóxicos no Brasil: Processo de registro, riscos à saúde e programas de monitoramento. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical,. (Documentos, 134). Disponível em: <[http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/documentos/documento\\_134.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/documentos/documento_134.pdf)>.

Accesado el día :17 mar. 2010.

Gestión, (2010). Brasil abriría su mercado a la cebolla, quinua y kiwicha de Perú. <http://gestion.pe/noticia/327734/brasil-abriria-su-mercado-cebolla-quinua-kiwicha-peruanas>. Acceso el día 4 de enero 2010.

Hajslova, J.; Holadova, K.; Kocourek, V.; Poustka, J.; Godula, M.; Cuhra, P.; Kempny, M. (1998). Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. Journal of Chromatography A, Amsterdam, v.800, p.283-295.

Hajslova, J and Zrostlýkova, J.( 2003). Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v.1000, p.181-197.

INMETRO. (2007). "INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL" -. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos: DOQ-CGCRE-008. Rev. 02. Rio de Janeiro: INMETRO. 24p

Imoto, M.N. (2004). Validação de método multiresíduo para pesticidas organohalogenados em maçã por cromatografia gasosa com captura de elétrons (GC/ECD) e cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG/MS). Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)-Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Jubete, A.L; Arendt, E.K, Gallagher, E, (2009). Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(S4): 240\_257.

Jian, Y; Li, X; Xu, J; Pan, C; Zhang, J. Niu, W. (2009). Multiresidue method for the determination of 77 pesticides in wine using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with mass spectrometry. *Food Additives and Contamination* Vol. 26, N°. 6, 859-866.

Kovalczuk, T; Lacina, O; Jech, M; Poustka, J; Hajslová J. (2008). Novel approach to fast determination of multiple pesticide residues using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), *Food Additives and Contaminants*, 25(4) pag 444-457.

Koesukwiwat, U; Lehotay, S.J; Miao, Leepipatpiboon, N. (2010). High Throughput Analysis of 150 Pesticides in Fruits and Vegetables using QuEChERS and Low-Pressure Gas Chromatography – Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A* (2008), doi:10.1016/j.chroma.2010.05.012

Lacorte, S. and Fernandez-Alba, A.R (2005). Sample introduction techniques. In: FERNANDEZ-ALBA, A.R. (Ed.). *Chromatographic-mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residues*. Amsterdam: Elsevier. cap.5, p.235-267. (Comprehensive Analytical Chemistry, 43).

Lanças, F.M. (2004). *Extração em fase sólida (SPE)*. São Carlos: Rima. 96p

Lanças, F.M. (2009). *Cromatografia Líquida moderna HPLC CLAE*. Editora Átomo. Impreso en el Brasil 382p.

Lavagnini, I.; Magno, F.; Seraglia, R.; Traldi, P. (2006). *Quantitative applications of mass spectrometry*. Chichester: John Wiley & Sons. 138p.

Lehotay, S.J ; Son, A.K ; Kwon, H.; Koesukwiwat, K.U; Fu, W.; Mastovska, K.; Hoh, E.; Natchanun, L.( 2010). Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 2548–2560

Lehotay, S.J.; Mastovska, K.; Lightfield, A.R. (2005). Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *Journal of AOAC International*, Arlington, v.88, n.2, p.615-629.

Lehotay, S.J. (2000). Analysis of pesticide residues in mixed fruit and vegetable extracts by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, Arlington, v.83, n.3, p.680- 697.

Lehotay, S.J.; Lightfield, A.R.; Harman-Fetcho, J.A.; Donoghue, D.J. (2001). Analysis of pesticide residues in eggs by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v.49, p.4589-4596.

Lehotay, S.J.; Mastovska, K.; Yun, S.J. (2005). Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *Journal of AOAC International*, Arlington, v.88, n.2, p.630-638.

Lehotay, S.J. (2007). Determination of pesticides residues in food by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *Journal of AOAC International* Vol.90. N°. 2, pag 485-520.

Moreno, F.J.L; Frenich, G.A; Bolaños, P.P; Vidal, M.J.L. (2008). Multiresidue method for the analysis of more than 140 pesticide residues in fruits and vegetables by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *J.Mass Spectrom.* 43: 1235-1254.

Mujica, S. A; Izquierdo, J; Marathee, J.P. (2001). QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.) Ancestral cultivo andino, alimento del presente y futuro. *Cultivos Andinos* versión 1.0. F.A.O.

Ministerio de Agricultura del Perú. (2007). Estadística agraria mensual.

Oka, T; Tooi, O; Mitsui, N; Miyahara, M; Ohnishi- Y; Takase, ; Kashiwag, A; Shinkai, T; Santo, N; Iguchi, T. (2008). Effect of atrazine on metamorphosis and sexual differentiation in *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology* 87. 215–226

Pang, G.F.; Cao, Y.Z.; Zhang J.J., Fan C.L.; Liu, Y.M.; Li, X.M.; Jia, G.Q.; Li, Z.Y.; Shi, Y.Q.; Wu, Y.P.; Guo, T.T. (2006). Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography cleanup/gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tándem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A, Amsterdam*, v.1125, p.1–30.

Pessini, M.M.O. (2003). Resíduos de Acetamiprid e Thiamethoxam em tomate estaqueado (*Lycopersicon esculentum* Mill.), em diferentes modalidades de aplicação. 2003. 71 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Pinho, G.P. (2007). Extração de pesticidas em amostras de tomate pelas técnicas: extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) e dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) para análise por cromatografia gasosa. 98f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

REGLAMENTO (UE) N o 196/2010 DE LA COMISIÓN. (2010) por el que se modifica el anexo I del Reglamento (CE) n o 689/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la exportación e importación de productos químicos peligrosos (Texto pertinente a efectos del EEE).

- Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, São Paulo, v.27, n.5, p.771-780.
- Repo, C. R; Espinoza, C; Jacobsen, S.E. (2003). Nutritional Value and Use of the Andean Crops Quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). *FOOD REVIEWS INTERNATIONAL* Vol. 19, Nos. 1&2, pp. 179–189.
- Sanches, S.M.; Silva, C.H.T.P.; Campos, S.X.; Vieira, E.M. (2003). Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicología e Meio Ambiente*, Curitiba, v.13, p. 53-58.
- Shen, G.; Hu, X.; Hu, Y. (2009). Kinetic study of the of the degradation of the insecticide pyretrozine in a vegetable-field ecosystem. *Journal of Hazardous Materials*. Amsterdam, v. 164, p.497-501, 2009.
- Schenck, F.J.; Lehotay, S.J.; Vega, V. (2002). Comparison of solid-phase extraction sorbents for cleanup in pesticide residue analysis of fresh fruits and vegetables. *Journal of Separation Science*, New York, v.25, p.883-890.
- Spadotto, C.A.; Gomes, M.A.F.; Luchini, L.C.; Andréa, M.M. (2004). Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, (Documentos, 42). Disponible en: [http://www.cnpma.embrapa.br/download/documentos\\_42.pdf](http://www.cnpma.embrapa.br/download/documentos_42.pdf). Acceso el día 28 de feb. 2010.

Stepan, R.; Ticha, J.; Hajslova, J. (2005). Baby food production chain: Pesticide residues in fresh apples and products. *Food Additives and Contaminants*, London, v.22, n.12, 1231-1242.

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

Tadeo, J.L. (2008). Analysis of pesticides in food and environmental samples. Editorial CRC Pres. Taylor and Francis Group. Boca Raton, London, New York. 382p.

Lanças, F.M. (2009). A cromatografia líquida e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”. *Scientia chromatographica*. Vol 1 num 2.

Lehotay, S.J. (2005). Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe approach for determining pesticide residues. In: MARTÍNEZ VIDAL, J.L.; FRENICH, A.G. (Ed.). *Pesticide protocols*. Totowa: Humana Press, p.239-261. (Methods in Biotechnology, 19).

Viñas, Oscar. (2000). Exportación de quinua orgánica (*Chenopodium quinoa* Willd.) de la República de Bolivia. La Paz, Bolivia. 14 p.

Zrostl'ykova, J.; Hajslova, J.; Godula M.; Mastovska, K. (2001). Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and oncolumn injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v.937, p.73-86.

# ANEXOS





## GALERIA FOTOGRÁFICA

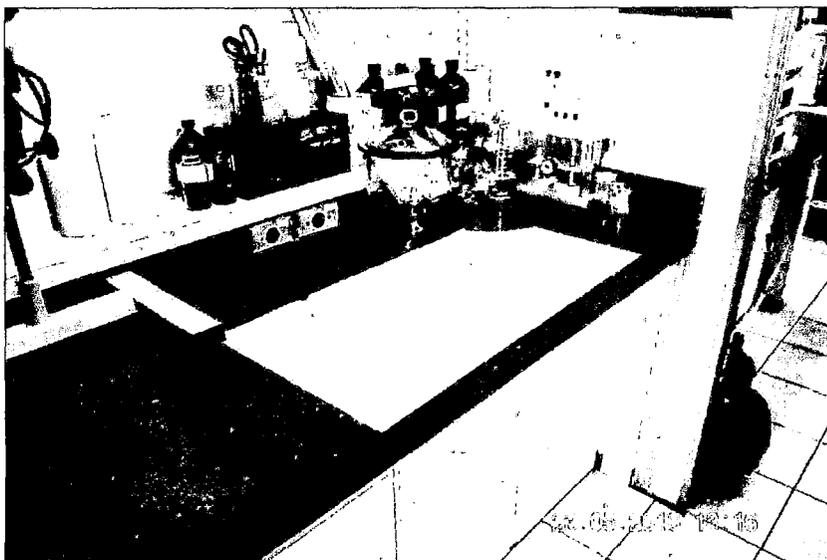


Foto 1. Preparo de la mesa para inicio de la extracción



Foto 2. Muestras de quínoa listas para análisis

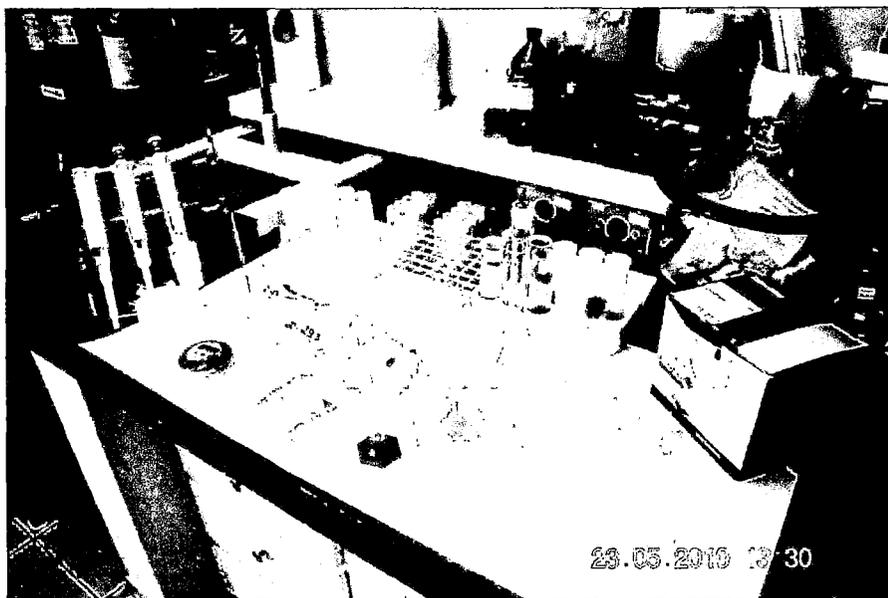


Foto 3. Material usado para La extracción



Foto 4. Cromatógrafo líquido acoplado a un tandem masa/masa (LC MS- MS)

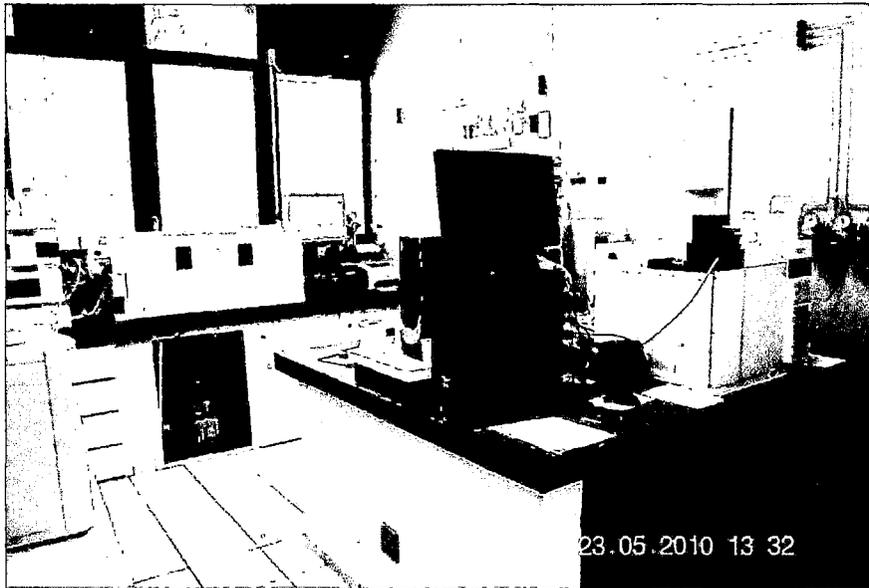


Foto 5. Sala de cromatografía (CENA USP).



Foto 6. Pesando muestras de quinua para inicio de análisis

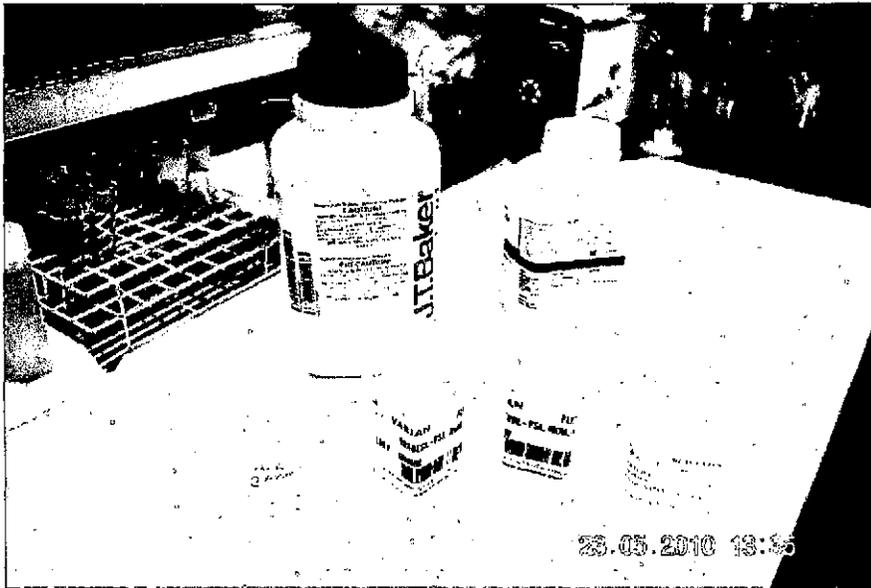


Foto 7. Reactivos usados en la investigación



Foto 8. Tubos de teflón de 50 mL conteniendo las muestras de quinua

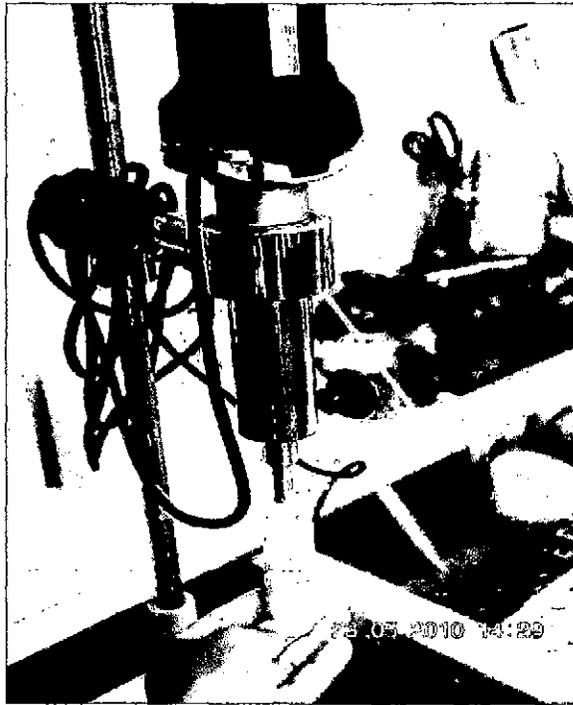


Foto 9. Homogenizador (blender)



Foto10. Primer clean up de la muestra

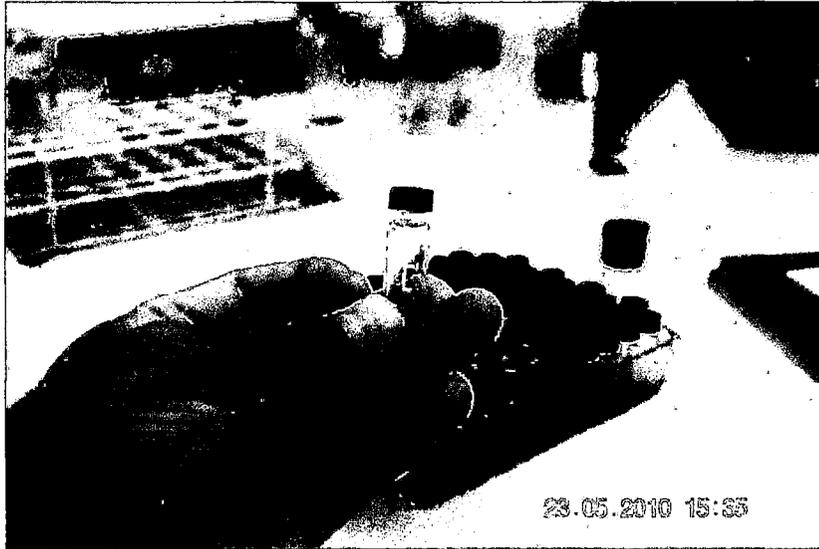


Foto 11. Etapa final del proceso de extracción acondicionamiento en el VIAL



Foto 12. Etapa final (filtrado de la muestra).