

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción**

“Determinación y Evaluación de Plaguicidas Residuales en
Banano Ecuatoriano de Consumo en la Ciudad de Guayaquil en el
Marco de Seguridad Alimentaria”

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERA DE ALIMENTOS

Presentada por:

Silvia Susana Huayamave Correa

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2007

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme la fortaleza para culminar esta etapa, a mi directora de tesis Ing. Carola Resabala por su invaluable ayuda, a mis familiares y amigos por estar siempre a mi lado. Además un agradecimiento especial al Ing. Mariano Montaña por su gran aporte a la culminación de esta tesis.

DEDICATORIA

A MIS PADRES

A MI HERMANO

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ing. Eduardo Rivadeneira P
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE

Ing. Carola Resabala Z.
DIRECTORA DE TESIS

Msc. Sandra Acosta D.

VOCAL

Ing. Mariano Montaña A.

VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de ésta Tesis de Grado, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación De la Espol)

Silvia Susana Huayamave Correa

RESUMEN

La Tesis: **“DETERMINACION Y EVALUACION DE PLAGUICIDAS RESIDUALES EN BANANO ECUATORIANO DE CONSUMO EN LA CIUDAD DE GUAYAQUIL EN EL MARCO DE SEGURIDAD ALIMENTARIA”**, se llevará a cabo en el laboratorio de Cromatografía del Instituto de Ciencias Químicas y Ambientales de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), ubicada en el km 30.5 vía perimetral, Campus Gustavo Galindo en la ciudad de Guayaquil.

Actualmente se lleva a cabo varios proyectos financiados por CICYT-ESPOL, CONESUP y SENACYT, entre los cuales destacan: Proyecto Semilla “Implementación de una metodología de análisis mediante técnicas cromatográficas para determinar residuos de pesticidas en frutas exportables, de acuerdo a estándares internacionales. Caso Banano y Piña” y Proyecto Conesup: “Establecimiento de la residualidad de fungicidas (triazoles y estrobirulinas) en hojas y frutos de banano en dependencia de los ciclos de aplicaciones fitosanitarias”, los cuales permiten el desarrollo de esta tesis.

El banano es un alimento fresco, de alto poder vitamínico y nutricional, que contiene elementos esenciales en una dieta balanceada, tales como carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales, por lo que debería

consumirse diariamente por todos los grupos de personas sin importar edad, sin embargo, a pesar de sus bondades nutricionales, la población general podría verse expuesta a la presencia de residuos de plaguicidas en el producto fresco como consecuencia de los tratamientos fitosanitarios, así como por los contaminantes ambientales, ya que debido a su naturaleza biocida, éstos pueden provocar diversos efectos tóxicos en distintos sistemas biológicos, constituyendo un daño potencial tanto para la población humana como para el medio ambiente en general.

El banano comparte con el petróleo los primeros puestos en generación de divisas para el país. Lastimosamente, el aumento de la oferta, la consecuente reducción de precios y de la rentabilidad ha provocado fuertes y recurrentes problemas económicos al sector, sin tomar en cuenta que el impulso de la industria alimenticia basada en productos y subproductos de banano, representa una oportunidad de generación de nuevos ingresos y aprovechamiento del banano de exportación rechazado.

A pesar de la importancia económica que representa para el país el cultivo de banano, el uso de cantidades considerables de plaguicidas para el combate de la temida “Sigatoka Negra”, puede provocar la presencia de residuos de estos compuestos tóxicos, constituyendo un riesgo toxicológico para los consumidores y una posible pérdida de mercado y de oportunidades

comerciales.

En este sentido, esta tesis incursiona en una de las temáticas mas sensibles como es la “Residualidad de Plaguicidas en productos alimenticios”, que de alguna manera proporcionará una línea base de la situación del banano y su oportunidad de aprovechamiento industrial generando nuevas alternativas productivas y garantizando la tan preciada salud del consumidor. Para lo cual se tiene como objetivos fortalecer la capacidad analítica local y evaluar los niveles de residualidad de plaguicidas en banano de los diferentes centros de abasto de la ciudad de Guayaquil.

Para lo cual se propone la siguiente metodología: se seleccionará y monitoreará 3 centros de abastos de banano fresco para posteriormente evaluar la residualidad mediante el planteo de un ensayo, empleando un diseño completamente al azar.

Los resultados serán analizados estadísticamente y se compararán las medias de los tratamientos.

Como resultados esperados principales se incluyen:

- (a) Una metodología analítica optimizada de residuos de plaguicidas
- (b) Un diagnóstico de la situación del banano de consumo interno en relación a plaguicidas residuales

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	II
INDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
SIMBOLOGIA.....	V
INDICE DE FIGURAS.....	VI
INDICE DE TABLAS.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1	
1. GENERALIDADES.....	3
1.1. Características del sector bananero ecuatoriano.....	4
1.1.1. Zonas productivas.....	7
1.1.2. Las exportaciones de banano en el mercado Internacional.....	8
1.2. Plaguicidas: Características y usos en el cultivo de Banano.....	10
1.3. Hábitos alimenticios de los ecuatorianos y Seguridad Alimentaria.....	26

1.4. Tecnologías analíticas de apoyo.

Técnicas cromatográficas y espectrofotométricas.....32

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS.....55

2.1. Localización55

2.2. Materiales.....56

2.2.1. Equipos de logística.....56

2.2.2. Equipos de laboratorio.....56

2.2.3. Reactivos.....58

2.3. Metodología.....59

2.3.1. Selección de centros de abasto
de la ciudad de Guayaquil.....59

2.3.2. Determinación de tamaño de muestra.....60

2.3.3. Muestreo60

2.3.4. Análisis de Laboratorio.....61

2.3.5. Análisis Estadístico78

CAPÍTULO 3

3. ANALISIS DE RESULTADOS.....	80
3.1. Implementación y optimización de una metodología analítica.....	81
3.2. Monitoreo de los principales centros de abasto de la ciudad de Guayaquil.....	92
3.3. Evaluación de resultados de residualidad de plaguicidas en banano, con respecto a los estándares internacionales de Seguridad Alimentaria establecidos por el Codex Alimentarius.....	94

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	97
--	----

APENDICES

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

°C	Grados Centígrados
cm	Centímetro
CV	Coefficiente de variación
Fig	Figura
g	Gramos
h	Hora
kg	Kilogramo
LMR	Límite máximo de residuos
Máx	Máximo
Min	Minuto
mm	Milímetro
ml/min	Mililitro por minuto
mg/kg	Miligramo por kilogramo
ng	Nanogramo
ng/μl	Nanogramo por microlitro
OMS	Organización Mundial de la salud
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
Tm	Toneladas métricas
Tr	Tiempo de retención
μm	Micrómetro
μl	Microlitro
Voc's	Compuestos orgánicos volátiles

SIMBOLOGÍA

% Porcentaje

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1.1	Zonas de mayor cultivo en Ecuador.....7
Figura 1.2	Estructura química del carbendazim.....19
Figura 1.3	Estructura química del thiabendazole.....20
Figura 1.4	Estructura química del bitertanol22
Figura 1.5	Estructura química del imazalil.....22
Figura 1.6	Estructura química del difenoconazole.....23
Figura 1.7	Estructura química del propiconazole.....24
Figura 1.8	Estructura química de la azoxystrobin.....25
Figura 1.9	Estructura química de la trifloxistrobin25
Figura 1.10	Diagrama de configuración básica de sistema HPLC UV/VIS.....41
Figura 1.11	Columna empacada para cromatógrafo de gases.....46
Figura 1.12	Columna capilar para cromatógrafo de gases.....48
Figura 1.13	Configuración básica de cromatógrafo de gases.....52
Figura 1.14	Diagrama de configuración básica de sistema de permeación de gel.....53
Figura 2.15	Pesaje de muestra banano.....68
Figura 2.16	Adición de Acetona a la muestra.....68
Figura 2.17	Adición de diclorometano:hexano(1:1) a la muestra.....69
Figura 2.18	Filtración de la muestra con SO ₄ Na ₂ purificado*69
Figura 2.19	Recolección de fase orgánica y enjuague final con etil acetato.....70
Figura 2.20	Concentración de la muestra banano con rotaevaporador.....70
Figura 2.21	Concentración de la muestra con nitrógeno.....71
Figura 3.22	Configuración básica de Sistema GC-ECD. Laboratorio de Comisión Ecuatoriana de Energía Atómica.....83
Figura 3.23	Configuración Básica de Sistema HPLC-UV-Vis/DAD. Laboratorio de Cromatografía ICQA-ESPOL.....84
Figura 3.24	Perfil cromatográfico de mezcla de patrones de plaguicidas determinados por HPLC85
Figura 3.25	Perfil cromatográfico de mezcla de patrones de plaguicidas determinados por GC85
Figura 3.26	Perfil cromatográfico imazalil.....85
Figura 3.27	Número de plaguicidas encontrados en centros de abasto.....95
Figura 3.28	Concentración de Imazalil en Centro de abasto 2.....95
Figura 3.29	Concentración de plaguicidas encontrados en los 3 centros de abasto.....96

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1	Exportaciones de los 8 primeros meses de los años 2005, 2006 y 2007.....9
Tabla 2	Composición nutricional de 100 gramos de banano.....29
Tabla 3	Límites máximos de residuos permitidos (LMR) por Codex Alimentarius.....32
Tabla 4	Porcentaje de recuperación de plaguicidas en banano método Brasil. Tecnología GC-ECD.....65
Tabla 5	Porcentaje de recuperación de plaguicidas en banano Método Brasil. Tecnología HPLC.....65
Tabla 6	Porcentaje de recuperación de plaguicidas en banano método CEEA. Tecnología GC-ECD.....66
Tabla 7	Porcentaje de recuperación de plaguicidas en banano método CEEA. Tecnología HPLC.....66
Tabla 8	Alcance de trabajo para determinación de plaguicidas Seleccionados.....67
Tabla 9	Cuadro de concentración de soluciones madres y solventes usados en la preparación de dichas soluciones.....73
Tabla 10	Niveles de concentración para mix HPLC(carbendazim, thiabendazol y bitertanol).....74
Tabla 11	Niveles de concentración para mix GC (azoxystrobin, propiconazole, difenoconazole y trifloxistrobin).....74
Tabla 12	Niveles de concentración imazalil.....75
Tabla 13	Alcance de método seleccionado.....81
Tabla 14	Condiciones cromatográficas establecidas para plaguicidas que se determinan por GC-ECD.....82
Tabla 15	Condiciones cromatográficas establecidas para plaguicidas que se determinan por HPLC-DAD.....83
Tabla 16	Tiempo Estimado de Retención de plaguicidas determinados por HPLC Y GC-ECD.....86
Tabla 17	Índices de linealidad (R^2).....87
Tabla 18	Porcentajes finales estimados de plaguicidas en muestras de banano88
Tabla 19	Coficiente de variación estimado de área en soluciones patrones inyectadas por tecnología HPLC-DAD.....89
Tabla 20	Coficiente de variación estimado de área en soluciones patrones inyectadas por tecnología GC-ECD.....90

Tabla 21	Coeficiente de variación estimado de tiempos de retención en soluciones patrones inyectadas por tecnología HPLC-DAD.....	90
Tabla 22	Coeficiente de variación estimado de tiempos de retención en soluciones patrones inyectadas por tecnología GC-ECD.....	90
Tabla 23	Límite estimado de detección (LD) y Cuantificación (LC) para mix HPLC.....	91
Tabla 24	Límite estimado de detección (LD) y Cuantificación (LC) para mix GC e imazalil.....	91
Tabla 25	Resultados de análisis de residuos de plaguicidas en muestras de banano.....	93

INTRODUCCIÓN

El uso de cantidades considerables de plaguicidas en el cultivo de banano para controlar enfermedades como la 'Sigatoka Negra' puede provocar presencia de residuos de estos compuestos, lo cual constituye un riesgo toxicológico para los consumidores, así como una posible pérdida de mercado y de oportunidades comerciales ya que como es de gran conocimiento, el banano es uno de los rubros más importantes de nuestro País, sin olvidar sus atributos nutricionales.

El objetivo de este trabajo es evaluar 9 plaguicidas muy usados en banano (carbendazim, thiabendazole, bitertanol, azoxystrobin, trifloxystrobin, imazalil, difenoconazol y propiconazole), por medio de la implementación y optimización de una metodología analítica con sistema de HPLC-UV-Vis (Cromatografía líquida de alta resolución con detección ultra violeta-visible) y GC-ECD (Cromatografía de gases con captura de electrones). Estos plaguicidas se han propuesto evaluarlos bajo normas internacionales (*Codex Alimentarius*) que permitan garantizar la salud de los consumidores ecuatorianos e incentivar el consumo de esta fruta por sus cualidades nutritivas y oportunidades productivas.

Una vez establecida y optimizada la metodología analítica, de modo que se garanticen la fiabilidad de los datos, se realizó un monitoreo a tres principales centros de abasto de la ciudad de Guayaquil para tener muestras representativas de banano, y de esta forma evaluar si existe residualidad de plaguicidas o no en ellas.

De ésta forma éste trabajo dejará implementada una metodología optimizada que permita determinar los plaguicidas en estudio por medio de dos técnicas analíticas como lo son la cromatografía de gases y la cromatografía líquida, lo que permitirá dar un diagnóstico de la situación del banano de consumo interno en relación a plaguicidas residuales.

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES

Probablemente el banano es originario de la región indomalaya. Desde Indonesia se propagaron hacia el sur y el oeste, alcanzando Hawai y la Polinesia por etapas. Los comerciantes europeos llevaron noticias del árbol a Europa alrededor del siglo III antes de Cristo, pero no lo introdujeron hasta el siglo X. De las plantaciones de África Occidental los colonizadores portugueses lo habrían llevado a Sudamérica en el siglo XVI.

Los frutos tienen forma curvada y la pulpa madura tiene un color crema y sabor dulce. Es una planta frutal monocotiledónea perteneciente a la familia Musáceas, florece en las áreas húmedas de los trópicos, alcanza una altura entre 3,50 y 4 metros de acuerdo a la densidad de plantación y a las condiciones de luminosidad en el sector. El color es

predominantemente verde y el racimo posee entre 7 y 10 manos con un número de frutos que fluctúan entre 11 y 13.

Las dos especies más conocidas en nuestro medio son: la *musa paradisíaca* que corresponde al plátano para cocción y la *musa sapientum* o banano. El objeto de este estudio se referirá a la segunda de estas especies, la *musa sapientum*.

El banano destaca en contenido de hidratos de carbono, por lo que su valor calórico es elevado. Los nutrientes más representativos de éste son el potasio, el magnesio, vitaminas, ácido fólico y fibra.

1.1 Características del sector bananero ecuatoriano

El banano ecuatoriano es un cultivo permanente que requiere de altos niveles de nutrientes para su adecuado desarrollo y alta productividad, debido a que genera una gran cantidad de masa foliar en cortos periodos de tiempo.

Ecuador es el líder por más de 4 décadas en el ámbito internacional bananero. El banano ecuatoriano es fundamental en el comercio mundial, ya que Ecuador no sólo es el primer exportador de esta fruta

desde 1952, sino también el segundo mayor productor. Existen unas 140.000 hectáreas cultivadas.

La calidad del producto ha influido para mantener el prestigio intacto y esto se debe principalmente a que nuestro País goza de condiciones climáticas excepcionales que han permitido que el País se convierta en un productor agrícola de excelente calidad.

Las variedades que el Ecuador ofrece al mercado internacional son: Cavendish, Gross Mitchel, Orito y Rojo.

La actividad bananera constituye la mayor fuente de empleo: un 12% de la población depende directa o indirectamente de este sector y ha desarrollado una industria verticalmente integrada (1).

El sector bananero se encuentra formado de alrededor de 6000 productores (entre pequeños, medianos y grandes), siendo los más numerosos los primeros, con 3825, cuyas plantaciones gozan de un nivel de tecnificación bajo y medio en su gran mayoría. Sólo las grandes plantaciones cuentan con elementos automatizados, procesos de producción que mejoran cada vez el producto y optimizan costos.

Debido a la gran oferta mundial del banano fresco y a las limitaciones en cuanto a la colocación de la fruta en el mercado internacional, una alternativa para productores y exportadores de diversos países del

mundo ha sido el desarrollo de productos como: puré de banano, harina de banano, flakes, chips, banano deshidratado, banano cubierto con chocolate, entre otros.

Es conocido además, que el mercado está cada vez más competitivo y los consumidores locales más exigentes, por lo cual la permanencia en el negocio internacional y mercado local ya no depende solo de buenos precios, por lo que los mejoramientos tecnológicos se convierten en elementos determinantes para su sustentabilidad. Los consumidores se están poniendo cada vez más exigentes, ya que no solo se fijan en la calidad del producto por su aspecto, sino también ponen más atención en cuestión de protección a la salud humana.

En cuanto a consumo interno, este es por definición el monto de la producción que no se exporta. Se distribuye en uso humano, en alimentación animal y en uso industrial. Se calcula que del total de banano producido del Ecuador, máximo un 9% se queda en el país, por lo que el incentivo al consumo de esta fruta debería ser de vital importancia debido a sus propiedades nutritivas, su accesibilidad y lo mejor es que puede ser consumidos por diferentes grupos de personas que van desde los mas pequeños, adultos y hasta ancianos.

1.1.1 Zonas productivas

En nuestro País el cultivo de banano se halla distribuido en todo el litoral Ecuatoriano.

Existen alrededor de 150 mil hectáreas de banano sembradas en el país. El ex programa Nacional del Banano ha identificado a 3 sectores preponderantes, con un 92% de la producción, entre las cuales tenemos las provincias de: El Oro con 33.4% (entre los cantones de Machala y Zaruma), Guayas con 30.3% (entre los pueblos de Jujan y Milagro) y Los Ríos con 28.3% (entre los pueblo de Babahoyo y Pueblo viejo, Catarama y Quevedo).



FIGURA 1.1 ZONAS DE MAYOR CULTIVO EN ECUADOR

FUENTE: Resabala c, 2004, Evaluación de la Banana Ecuatoriana de Acuerdo con Estándares Internacionales de Seguridad Alimentaria, para Garantizar su Certificación y Fortaleza Competitiva

El Oro posee la mayor cantidad de productores, ya que de 6282 productores, El Oro tiene 2890, seguido por Guayas con 1962, y Los Ríos con 857. La demás cantidad de productores está registrada en Canar (214), Cotopaxi (170) y Esmeraldas (162).

Sin embargo, Los Ríos ha sido el principal productor de banano, no solamente en el Ecuador sino en el resto del mundo, con 55583 hectáreas cultivadas de banano y 2475 haciendas, seguida por El Oro con 46397 hectáreas y Guayas con 46050 hectáreas.

El cantón el Guabo (El Oro) es el mayor productor, con 16285 hectáreas, seguidas por Quevedo con 15486 hectáreas.

1.1.2 Las exportaciones de banano en mercado internacional

Ecuador participa a nivel mundial con aproximadamente el 30 % del comercio de la fruta.

El incremento de la producción mundial implica mayor competencia para el Ecuador, lo cual podría conducir a perder participación de mercado si el país no establece estrategias para volverse más competitivo, reducir costos y ampliar o abrir nuevos mercados.

De acuerdo con las estadísticas, nuestra fruta se destina

fundamentalmente hacia los mercados de Europa, con alrededor del 42 %. En la venta, el nuestro es el mercado que ofrece mejores precios en los países de la Unión Europea. Le siguen en importancia de la demanda, Estados Unidos con un 36%, seguido de Rusia, países del Este, Chile, Nueva Zelanda, Argentina, Japón y China.

El banano ecuatoriano puede encontrarse en los mercados internacionales bajo las siguientes marcas: Bonita, Dole, Chiquita, Favorita, Del Monte, Goldfinger, entre otros.

A continuación se presenta la tabla 1 de las exportaciones de los primeros 8 meses de los años 2005, 2006 y 2007

TABLA 1

**EXPORTACIONES DE LOS 8 PRIMEROS MESES DE LOS
AÑOS 2005, 2006 Y 2007**
FUENTE: Estadísticas SICA

Mes	2005	2006	2007
	Cajas (unidades)	Cajas (unidades)	Cajas (unidades)
Enero	20.773.496	21.105.136	23.668.964
Febrero	18.881.846	19.973.146	20.283.727
Marzo	22.308.406	23.454.439	23.186.184
Abril	22.973.638	23.319.471	23.574.173
Mayo	20.359.774	21.053.444	22.132.326
Junio	17.211.698	17.639.474	20.746.705
Julio	18.954.473	17.746.749	19.678.456
Agosto	18.617.708	16.786.417	20.167.493
TOTAL	160.081.022	161.078.276	173.438.028

1.2 Plaguicidas: Características y usos en el cultivo de Banano.

De acuerdo al Codex Alimentarius(FAO/OMS), se entiende por plaguicida a cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga incluyendo vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especie no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que puedan administrarse a los animales para combatir ectoparásitos. Este concepto engloba tanto a los restos de molécula del plaguicida original como a los metabolitos con significación toxicológica.

El uso continuo de pesticidas para combatir plagas, enfermedades y malezas que atacan a los cultivos de banano en el Ecuador conlleva a la presencia de residuos de plaguicidas en dicho alimento, que en los últimos años se ha convertido en una constante preocupación para los consumidores puesto que incide directamente sobre la seguridad alimentaria. Una estadística del uso de plaguicidas en nuestro País, es conocer que el volumen de importación de fungicidas en Ecuador durante el año 2001 fue de 12898 Tm, según

las estadísticas del Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador.

En cuanto a clasificación de plaguicidas se refiere, estos forman un grupo de compuestos muy amplio y heterogéneo, por lo que existen diversas varias formas de clasificarlos. En cuanto al tipo de organismo que se trata de controlar existen: insecticidas, acaricidas, nematocidas, moluscocidas, rodenticidas, herbicidas, antibióticos y fungicidas. Los compuestos de este estudio pertenecen al grupo de los fungicidas, que actúan contra hongos y parásitos causantes de enfermedades en los cultivos bananeros.

Por su modo de acción existen las siguientes formas de clasificación: por contacto, por inhalación, por ingestión, mixtos, repelentes, atrayentes, adulticidas, larvicidas, ovicidas, preventivos penetrantes y curativos o sistémicos, calificando así como preventivo penetrante al bitertanol, que actúa contra hongos de penetración incipiente o superficial, y curativos o sistémicos al thiabendazol y carbendazin, que se aplican en la planta ya infectada, penetrando en el interior de ésta impidiendo el desarrollo del hongo(2).

1.2.1 Toxicidad de los plaguicidas

La toxicidad de los pesticidas en general presenta distintos aspectos según su distinta trascendencia. Por lo que a sus efectos más inmediatos se refiere, se consideran varias clases de toxicidad (3):

Toxicidad oral aguda: es la ingestión de una sola vez de un producto pesticida tóxico. Se expresa en términos de dosis letal media, DL50, que significa la cantidad de tóxico que es necesario ingerir de una sola vez para producir la muerte del 50% de los animales en el ensayo. Se expresa normalmente en miligramos por kilogramos de peso del animal ensayado.

Toxicidad dérmica: se refiere a los riesgos tóxicos debidos al contacto y absorción del plaguicida por la piel. Se expresa igual que el anterior, en términos de DL50 y en miligramos por kilogramo.

Toxicidad crónica: mediante dietas alimentarias preparadas con dosis variadas del tóxico que se estudia, se averiguan los niveles de riesgo del pesticida a través de su ingesta diaria a los animales de ensayo durante periodos de largo tiempo (hasta 2 años)

Toxicidad sub-aguda o sub-crónica: aquí el efecto que se toma en consideración no es la muerte del animal. Puesto que las dosis administradas son mas bajas que en la exposición aguda, los efectos también son menos externos y se registran todas las alteraciones producidas en todos los tejidos y fluidos corporales.

1.2.2 Residuos de plaguicidas en alimentos

Se entiende por residuo de plaguicida a cualquier sustancia o agente biológico especificado presente en o sobre un producto agrícola o alimento de uso humano o animal como consecuencia de la exposición a un producto fitosanitario. El término incluye los metabolitos y las impurezas consideradas de importancia toxicológica (4).

El grado de exposición del ser humano a los residuos en alimentos depende de los tratamientos que efectúen los agricultores en el campo y en post-recolección y del tiempo transcurrido desde la aplicación del plaguicida hasta el momento del consumo (2).

Después del tratamiento con plaguicidas, queda sobre las plantas de banano una cantidad determinada del mismo, al que se le llama depósito de plaguicida. Dicha cantidad varía en función de algunos factores como: dosis, naturaleza química del plaguicida, ciclos de aplicación, condiciones climáticas, etc.

La cantidad del residuo presente en el momento del consumo del producto depende del depósito inicial y del tiempo transcurrido

1.2.3 Fungicidas

Un fungicida es un compuesto que mata a los hongos. También se aplica el concepto de fungicidas a aquellos productos que inhiben la esporulación (antiesporulante o genestático) o detienen el crecimiento (fungiestáticos).

Desde el punto de vista epidemiológico, el uso de fungicidas puede reducir el inóculo inicial y/o disminuir la tasa epidemiológica de infección (aplicación foliar). Estos son utilizados desde hace mucho tiempo y han evolucionado considerablemente con el resultado de la aparición de nuevas moléculas químicas eficientes (Ej. estrobilurinas) y generando un importante mercado económico y competitivo.

A modo de ejemplo la residualidad de un mismo fungicida puede ser menor cuando:

- 1) Se utilizan dosis menores a las recomendadas, favoreciendo así una más rápida reinfección.
- 2) Cuando la condiciones ambientales no son las adecuadas (alta temperatura, baja humedad) que generarán pérdidas importantes del fungicida por evaporación, baja penetración, etc.
- 3) Si se retrasa el momento de aplicación, la enfermedad crecerá más allá de los primeros síntomas, y limitará la eficiencia y movilidad del fungicida.
- 4) Cuando el volumen de agua utilizado no permite lograr una densidad y tamaño de gotas recomendados provocando un menor mojado de los estratos del follaje y por lo tanto una menor protección.

1.2.3.1 Modo de acción de fungicidas

Este aspecto hace referencia al movimiento de la sustancia una vez depositado sobre las hojas.

Un fungicida sistémico es absorbido y translocado por el xilema, pero algunos de ellos también se mueven en forma translaminar (se mueven atravesando la hoja).

La característica de “sistémicos” de los fungicidas (ej. los triazoles, benzimidazoles) debe ser interpretada como que el fungicida se mueve “parcialmente “ dentro de la planta pero no con la misma eficiencia como lo hacen otros compuesto como algunos herbicidas.

La residualidad varia entre 15 a 25 días (depende del producto, dosis, nivel de enfermedad y calidad de aplicación)

De modo general la liberación del fungicida ocurre gradualmente observándose en ellos un efecto residual mayor resistiendo más a las condiciones ambientales adversas y a la remoción por el agua.

Por lo tanto, el mecanismo de acción de los fungicidas hace referencia de cómo la sustancia química mata a la célula fúngica.

- ✓ Los benzimidazoles interfieren la mitosis (No usados para Roya asiática)
- ✓ Los triazoles inhiben la síntesis del ergosterol, componente de la pared celular de los hongos

- ✓ Las estrobilurinas afectan el proceso respiratorio (ATP, mitocondrias).

1.2.4 Benzimidazoles

Los benzimidazoles son fungicidas localmente sistémicos en la hoja con acción preventiva y curativa.

Fueron introducidos para el control de la Sigatoka en 1970 y debido a su excelente acción fueron utilizados a gran escala. Sin embargo el uso excesivo de los benzimidazoles causó la generación de resistencia por parte del patógeno en Honduras, Guatemala, Surinam y las Antillas francesas, lo que ocasionó que actualmente se usen combinados con otros fungicidas. El modo de acción de los benzimidazoles se basa en la acción de los microtúbulos del citoplasma causando desórdenes en la estructura celular del patógeno, ocasionando la inhibición de la mitosis. La selectividad con la que actúan estos compuestos se atribuye a la unión específica entre el benzimidazol y las tubulinas de los microtúbulos celulares del hongo.

Por lo que respecta a su constitución química, pueden distinguirse dos grupos de derivados benzimidazólicos, como los derivados del tipo benomilo, al que pertenece el carbendazin y los derivados tipo thianbendazole (2).

En general estos compuestos presentan una limitada solubilidad en agua a pH fisiológico, pero son muy solubles en condiciones fuertemente ácidas.

Actualmente para evitar la resistencia y para mantener estos fungicidas en el programa de control de Sigatoka negra, se recomienda máximo de 4 a 6 aplicaciones de benzimidazoles por año con aplicaciones bien alternadas con fungicidas de otro modo de acción.

Los benzimidazoles que son objeto de este estudio son: el carbendazim y thiabendazole

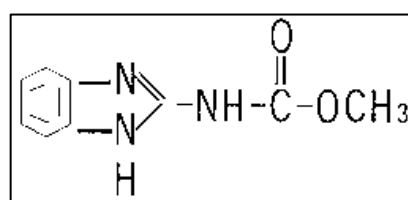
1.2.4.1 Carbendazim

En cuanto al carbendazim, este es físicamente, el carbendazim puro es un polvo cristalino, con punto de ebullición de 306 grados centígrados, el producto técnico es blanco ligeramente café, sin olor, cristalino, y su punto de ebullición es 290 grados centígrados. Insoluble o fuertemente soluble en solventes orgánicos, soluble en ácidos minerales y ácido acético a formar sal. Es no corrosivo, estable al calor y no fácil de ser quemado. Es

el metabolito de transformación del benomilo y de otros fungicidas como el tiofanato de metilo, también incluido en el grupo de derivados del tipo benomilo, por lo que es el principal residuo presente en plantas como producto de la aplicación de los fungicidas antes mencionados.

Como tal, el carbendazim posee una acción protectora y curativa, siendo absorbida a través de la raíz hasta el resto de la planta. Su uso radica en el control de una serie de enfermedades fúngicas presentes en cereales, uvas, tomates, manzanas, bananos y frutas en general. Puede permanecer estable en condiciones ácidas y se descompone lentamente a 2-aminobenzimidazol bajo condiciones básicas.

Su estructura química se muestra en la figura 1.2:



**FIGURA 1.2 ESTRUCTURA QUÍMICA DEL
CARBENDAZIM**

1.2.4.2 Thiabendazole

El uso del thiabendazole se expandió rápidamente en el tratamiento pos-cosecha de cítricos, manzanas, peras y bananas, debido a la eficacia para combatir el *Penicillium* a baja dosis. También es empleado en el tratamiento de semillas y de suelo, aparte de una serie de aplicaciones foliares, sólo o combinado con otros fungicidas.

Su estructura química se muestra en la figura 1.3:

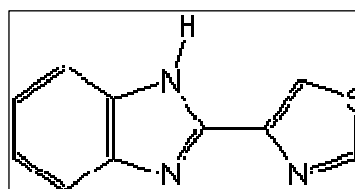


FIGURA 1.3 ESTRUCTURA QUÍMICA DEL THIABENDAZOLE

1.2.5 Azoles

Estos representan una importante clase de fungicidas sistémicos, aunque algunos de ellos no lo sean realmente, pero forman parte de este grupo debido a su estructura química, como es el caso del bitertanol. Se utilizan como aerosoles foliares, penetran a la planta y se desplazan desde el sitio de la aplicación distribuyéndose por toda la planta, siendo esta su principal ventaja (2).

Son estables a la temperatura y a fenómenos de hidrólisis, poco solubles en agua y solubles en disolventes orgánicos.

Los azoles presentan ciertas características comunes en sus diversas estructuras, como la presencia de un anillo 1,2,4-triazol o un anillo imidazol. Es la presencia de este anillo lo que hace sub clasificarlos en imidazoles y triazoles; y aunque se consideran juntos porque comparten el mismo espectro antimicótico y el mismo mecanismo de acción, los triazoles se metabolizan más lentamente y tienen menores efectos sobre la síntesis de esteroides endógenos.

Su modo de acción radica en interferir en la inhibición de las biosíntesis del ergosterol, el cual es un esteroide esencial para la membrana y para la función de la pared celular de algunos hongos, por lo que el bloqueo de la síntesis del ergosterol produciría la muerte de la célula o una fuerte inhibición del crecimiento del hongo.

1.2.5.1 Bitertanol

El bitertanol es un fungicida muy eficaz con un amplio espectro de acción. La sustancia activa penetra en el

tejido vegetal de modo que posee cierto efecto de profundidad. Es clasificado como escasamente móvil y como moderadamente persistente y ha sido estudiado en agua y sedimento, comprobándose la rápida partición desde el agua al sedimento (60% en 2-3 horas) (2).

Su estructura química se muestra en la figura 1.4:

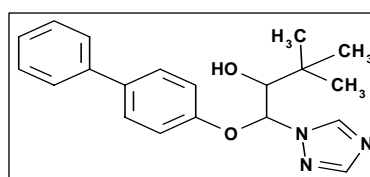


FIGURA 1.4 ESTRUCTURA QUÍMICA DEL BITERTANOL

1.2.5.2 Imazalil

Es un fungicida sistémico inhibidor de la biosíntesis del ergosterol que combate los hongos. Es efectivo para el tratamiento de semillas. Posee un espectro de aplicación más amplio que el thiabendazole y es activo frente a cepas resistentes a este tipo de compuestos.

Su estructura química se muestra en la figura 1.5:

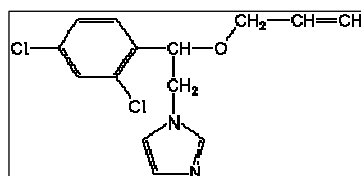


FIGURA 1.5 ESTRUCTURA QUÍMICA DEL IMAZALIL

1.2.5.3 Difenoconazole

Es un inhibidor de la demetilación del esterol. Inhibe la biosíntesis del ergosterol de las membranas celulares, deteniendo el desarrollo de los patógenos. Actúa primordialmente en el desarrollo de las hifas secundarias del patógeno dentro de los tejidos de la planta. Es un fungicida de sistemicidad local con acción primordialmente curativa que es absorbido muy rápidamente por las hojas, pero posteriormente se mueve muy poco ascendentemente. Su estructura química se muestra en la figura 1.6:

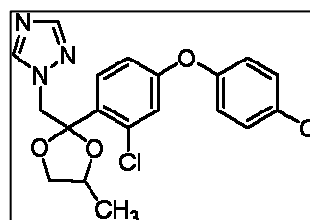


FIGURA 1.6 ESTRUCTURA QUÍMICA DEL DIFENOCONAZOLE

1.2.5.4 Propiconazole

El propiconazol es un fungicida foliar sistémico con un amplio espectro. Es usado en la mayoría de los cereales y controla las enfermedades causadas por *Erysiphe graminis*, *Leptosphaeria nodorum*, *Pseudocercospora*

herpotrichoides, Puccinia spp., Pyrenophora teres, Rhynchosporium secalis, y Septoria spp.

Su estructura molecular se presenta en la figura 1.7:

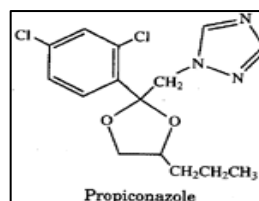


FIGURA 1.7 ESTRUCTURA QUÍMICA DEL PROPICONAZOLE

1.2.6 Estrobirulinas

Son la nueva clase de fungicidas sistémicos modernos en el mercado que actúan sobre las membranas de las mitocondrias inhibiendo el transporte de electrones a nivel del citocromo bc₁, lo que genera que la célula no pueda obtener energía para sus procesos vitales, con lo cual el hongo detiene su crecimiento y muere.

1.2.6.1 Azoxystrobin

La azoxystrobin fue el primero de la nueva clase de fungicidas, las estrobirulinas, en ser comercializado (1998) y que son líderes en el mundo. Es un fungicida sistémico de amplio espectro y actúa sobre cuatro

hongos patógenos entre ellos: Ascomycetes (moho), Basidiomycetes (raíces), Deutoromycetes (perfora) and Oomycetes. Su estructura molecular se presenta en la figura 1.8:

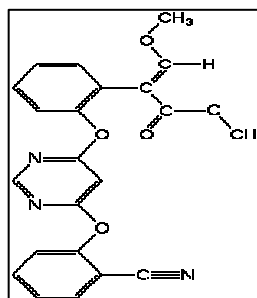


FIGURA 1.8 ESTRUCTURA QUÍMICA DE AZOXYSTROBIN

1.2.6.2 Trifloxystrobin

Tiene actividad mesosistémica caracterizada por una alta afinidad con la superficie foliar, siendo absorbido por las capas cerosas, redistribuyéndose por toda la superficie de la planta por vapor superficial ya que va liberándose en pequeñas cantidades.

Su estructura química se presenta en la figura 1.9:

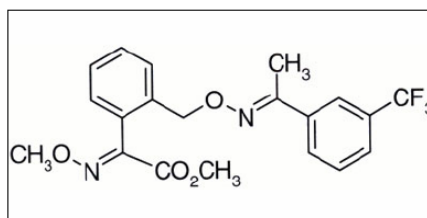


FIGURA 1.9 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA TRIFLOXYSTROBIN

1.3 Hábitos alimenticios de los ecuatorianos y Seguridad alimentaria

1.3.1 Hábitos alimenticios

A pesar de todas las bondades nutritivas del banano que se mencionarán mas adelante, en nuestro País no se ha inculcado la cultura de alimentación en base a esta fruta tan completa y relativamente económica, consecuencia de la desvalorización de la fruta o desconocimiento de sus bondades.

La esencia de fomentar el consumo de frutas deben formar parte de nuestros hábitos, los cuales corren el peligro de perderse con el tiempo por lo que hay que incentivar el consumo de frutas, lo que significa que los pequeños, adultos y ancianos prefieran consumir alimentos nuestros con altos valores nutriciones como el banano para disminuir los índices de desnutrición y malnutrición en el Ecuador (5%- 25% de los niños y niñas menores de 5 años). Evitar q los productos chatarras reemplace a los alimentos tradicionales y ricos en nutrientes que requieren sobre todo los niños en la educación, ya que estas comidas son perjudiciales para la salud por sus altos contenidos en grasa.

El banano ecuatoriano es uno de los alimentos mas completos que existen en la naturaleza, por ser rico en nutrientes benéficos para la salud y belleza, además de tres azúcares principales como lo son la sacarosa, glucosa y fructosa. Es una fuente de fibra rica en vitamina C, A, k, ácido fólico, potasio, hierro y zinc, nutrientes que nos ayudan a satisfacer las necesidades dietéticas que el organismo necesita, además de proporcionarnos el 20% del subsidio recomendado de la vitamina B6, la cual permite la correcta utilización de las proteínas que requerimos.

Su alto contenido en potasio, pero bajo en sal, la hace un alimento perfecto para ayudar a vencer la tensión arterial alta, por lo que la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos acaba de permitir que la industria bananera afirme oficialmente que esta fruta es capaz de reducir el riesgo de tensión arterial y de apoplejía.

Por otro lado, siendo el potasio un mineral que ayuda a normalizar el ritmo cardíaco, envía oxígeno al cerebro y regula el balance hídrico del cuerpo, cuando estamos estresados nuestro índice metabólico aumenta, reduciendo los niveles de

potasio, lo que puede balancearse con la ayuda de la ingesta de banano. Ideal para desórdenes intestinales por su textura y suavidad. Además es la única fruta cruda que se puede comer en casos de úlcera crónica. También neutraliza la hiperacidez y reduce la irritación ya que recubre las paredes del estómago.

Al poseer fibra, es excelente para la dieta con personas que sufren estreñimiento ya que ayuda a restaurar la acción intestinal normal, evitando recurrir a laxantes.

El hierro puede estimular la producción de hemoglobina en la sangre, mejorando los casos de anemia.

El magnesio se relaciona con el funcionamiento del intestino, nervios y músculos, forma parte de huesos y dientes, mejora la inmunidad y posee un suave efecto laxante. El ácido fólico interviene en la producción de glóbulos rojos y blancos, en la síntesis de material genético y la formación de anticuerpos en el sistema inmunológico.

Como se puede apreciar, el banano es realmente un alimento completo. Al compararlo con la manzana, tiene 4 veces más proteínas, el doble de carbohidratos, el triple de fósforo, cinco veces más hierro y vitamina A, y el doble de las otras vitaminas

y minerales. Además es rica en potasio y representa uno de los alimentos más económicos que existen.

A continuación se mostrará la tabla 2 con la composición nutricional por 100 gramos de porción comestible de banano:

TABLA 2
COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE 100 GRAMOS DE BANANO

FUENTE: <http://www.dulong.com.ar>

Calorías	85.2
Hidratos de carbono(g)	20.8
Fibra (g)	2.5
Magnesio (mg)	36.4
Potasio (mg)	350
Provitamina A (mcg)	18
Vitamina C (mg)	11.5
Acido fólico (mcg)	20

1.3.2 Seguridad alimentaria

Se entiende por seguridad alimentaria al acceso material y económico a alimentos suficientes, inocuos y nutritivos para todos los individuos, de manera que puedan ser utilizados adecuadamente para satisfacer sus necesidades nutricionales y llevar una vida sana, sin correr riesgos indebidos de perder dicho acceso. Esta definición incorpora los conceptos de

disponibilidad, acceso, uso y estabilidad en el suministro de alimentos.

La seguridad alimentaria implica el cumplimiento de las siguientes condiciones:

- ✓ Una oferta y disponibilidad de alimentos adecuados
- ✓ La estabilidad de la oferta sin fluctuaciones ni escasez en función de la estación del año
- ✓ El acceso a los alimentos o la capacidad para adquirirlos
- ✓ La buena calidad e inocuidad de los alimentos

Uno de los principales desafíos en nuestro País es lograr la seguridad alimentaria y nutricional de la población y mejorar el capital humano. La salud y la nutrición de la población cumplen un rol fundamental, aunque poco comprendido, como insumo en los procesos de desarrollo del país.

Los consumidores de productos agrícolas tropicales y productos elaborados a base de banano son cada vez más exigentes con respecto a la seguridad alimentaria. Dicha exigencia incluye, entre otras, ausencia de residuos de plaguicidas y sustancias tóxicas e inocuidad microbiológica. Esto está impulsando un cambio de actitud en los productores bananeros ecuatorianos,

que necesita ser complementada con metodologías de análisis potentes que determinen la idoneidad del fruto en fresco y sus elaborados.

Por lo tanto, estas nuevas realidades exigen por parte de los productores la utilización de paquetes tecnológicos que aseguren mayores niveles de productividad y calidad del producto.

El Codex Alimentarius es una Comisión creada en 1963 por la FAO y la OMS para desarrollar normas alimentarias, reglamentos y otros textos relacionados tales como códigos de prácticas bajo el Programa Conjunto FAO/OMS de Normas Alimentarias. Las materias principales de este Programa son: la protección de la salud de los consumidores, asegurar unas prácticas de comercio claras y promocionar la coordinación de todas las normas alimentarias acordadas por las organizaciones gubernamentales y no gubernamentales.

De acuerdo al Codex Alimentarius de la FAO/OMS, el término residualidad se refiere los plaguicidas que permanecen en productos alimentarios y/o partes del vegetal o animal (3).

Límite máximo de residuo es el límite legal de plaguicidas (expresado en mg/kg de producto) en alimentos.

Los estándares de seguridad o límites máximos de residuos permitidos (LMR) que ha establecido el Codex Alimentarius para los 8 compuestos en estudio se muestran en el siguiente cuadro:

TABLA 3
LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS PERMITIDOS (LMR) POR
CODEX ALIMENTARIUS

Plaguicida	LMR Codex (mg/kg)
Bitertanol	0.5
Thiabendazole	5
Carbendazim	1
Imazalil	2
Trifloxistrobin	0.05
Propiconazole	0.1
Difenoconazole	-
Azoxystrobin	-

1.4 Tecnologías analíticas de apoyo. Técnicas cromatográficas y espectrofotométricas

1.4.1 Cromatografía

La cromatografía es la técnica que separa una mezcla de solutos basada en la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos que se establece al ser arrastrados por una fase móvil (líquida o gaseosa) a través de un lecho cromatográfico

que contiene la fase estacionaria, la cual puede ser sólida o líquida.

Como técnica analítica instrumental es capaz de proporcionar información tanto cualitativa como cuantitativa acerca de la composición de la mezcla, además de que las especies separadas se pueden caracterizar empleando los detectores apropiados.

1.4.2 Cromatografía de fase líquida de alta presión o precisión (HPLC)

Para compuestos con poca volatilidad tales como moléculas grandes y altamente polares, suele emplearse la cromatografía líquida (LC), en donde la fase móvil es un líquido en la cual los componentes de la muestra deben ser solubles, realizándose separaciones físicas de mezclas de compuestos orgánicos naturales y sintéticos la mayoría de veces a temperatura ambiente.

En la actualidad HPLC (High Performance Liquid Chromatography) o cromatografía líquida de alta resolución ha llegado a ser una de las técnicas del laboratorio moderno más importantes como herramienta analítica para separar y detectar

compuestos químicos, por lo que permite realizar análisis cualitativos y cuantitativos sobre diferentes compuestos, de aminoácidos, aniones y cationes, carbohidratos, polímeros de bajo, medio y alto peso molecular, polímeros de alto punto de fusión o solubles a altas temperaturas, elastómeros, micotoxinas (aflatoxinas, etc.), péptidos, pesticidas, proteínas y enzimas, vitaminas lipo e hidrosolubles, tocoferoles, metales, colorantes naturales, triglicéridos, antibióticos, herbicidas, análisis de agroquímicos y medioambientales, etc.

Los componentes básicos de un sistema HPLC son: una bomba que permita el flujo de la fase móvil, un inyector para introducir la muestra en el sistema, una columna que contiene la fase estacionaria y un detector para determinar la separación y proporcionar los datos necesarios para la evaluación cualitativa y cuantitativa de los resultados.

Los compuestos son separados inyectando la muestra en la columna por medio del inyector. Los diferentes componentes en la mezcla pasan por la columna a diferentes velocidades debido a diferencias de su comportamiento de distribución entre la fase móvil líquida y la fase estacionaria.

1.4.2.1 Formas de cromatografía líquida

Fase Normal

Fue el primer tipo de sistema HPLC utilizado en el campo de la química, y se caracteriza por separar los compuestos en base a su polaridad. Esta técnica utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar, y se utiliza cuando el compuesto de interés es bastante polar. El compuesto polar se asocia y es retenido por la fase estacionaria.

Se usa una fase móvil no polar como hexano, diclorometano modificado con isopropanol. Excelente para analitos no polares, isómeros, separación de grupos, y para limpieza de muestras.

Fase Reversa

La separación es basada en los coeficientes de partición entre la fase móvil y la fase estacionaria. Esta se basada en la partición del analito en una fase estacionaria hidrofóbica ligada a un soporte de sílica.

El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.

La cromatografía de fase reversa es tan utilizada que a menudo se lo denomina HPLC sin ninguna especificación adicional. Se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar.

Usa fase móvil polar tal como una mezcla de metanol/acetonitrilo y agua; en donde los analitos polares eluyen primero mientras analitos no polares son retenidos más tiempo.

Sirve para analitos polares (solubles en agua), de polaridad media y algunos analitos no polares.

Intercambio iónico

En la cromatografía de intercambio iónico, la retención se basa en la atracción electrostática entre los iones en solución y las cargas inmovilizadas a la fase estacionaria

Se usa para separar analitos iónicos o ionizables. La fase móvil usa soluciones buffer de diferente pH y fuerza iónica.

Sus aplicaciones comunes son el análisis de iones, aminoácidos, proteínas/péptidos, polinucleótidos, etc.

1.4.2.2 Partes principales de un HPLC

Columna

El corazón del sistema es la columna donde ocurre la separación, la cual tiene diferentes dimensiones, longitudes y diámetros según el modelo y la aplicación.

En cuanto a la longitud de la columna se debe saber que la eficiencia y presión de ésta es proporcional a su longitud, que las columnas pueden ser conectadas juntas para producir una columna más larga con una más alta eficiencia, que los largos comunes son de 10-25 cm., y que existen mini columnas veloces de longitud 3-10 cm con empaquetamiento de pequeñas partículas (3 μm).

Las características típicas de una columna para HPLC son:

- ✓ 150 - 250 mm longitud x 4.6 mm i.d. Empacada con 5 o 10- μ m de fases C18
- ✓ Rango de Flow rate 1 - 2 mL /min usando fase móvil de metanol o acetonitrilo en agua.
- ✓ Carga de muestra de 1 ng a 1 mg
- ✓ Rango de operación de presión 500 - 2000 psi
- ✓ Tiempo de vida de la columna 500 - 2000 inyecciones o 3 - 24 meses

Bomba

La bomba para el HPLC debe tener los siguientes requerimientos:

- ✓ Alta precisión (<0.5%)
- ✓ Las velocidades de flujo pueden estar entre 0.1 mL - 5 mL/min para columnas analíticas.
- ✓ Debe permitir alta presiones de operación (hasta 5000 psi).
- ✓ Debe ser compatible con la mayoría de los eluyentes como lo son los solventes orgánicos, buffers y sales.

- ✓ Debe ser construida con materiales inertes como acero inoxidable, PEEK, teflón, titanio, rubí, zafiro etc.
- ✓ Debe poseer fácil mantenimiento y servicio
- ✓ Las bombas para 2 o 4 solventes deben tener buena exactitud en la composición y precisión en la programación de gradientes.

Inyector

Existen 2 clases de inyectores en HPLC, los cuales son el inyector manual y es autosampler.

Un inyector manual se compone de la válvula, rotor, loop de muestra y puerto para la aguja. Este permite una introducción de la muestra precisa de acuerdo a la cantidad de inyección del sistema

La muestra es introducida en el loop de muestra usando una jeringa en la posición LOAD, luego dicha muestra es inyectada dentro de la columna cambiando la posición de la válvula a INJECT.

El inyector autosampler inyecta muestras automáticamente desde viales que se colocan dentro del HPLC y se compone de una válvula ensamblada

automáticamente y una aguja movable conectada a la bomba de muestreo.

Posee cubetas en donde se colocan los viales, que pueden llegar a ser 100, el volumen de inyección puede ser de 0.1 – 2500 μL , posee alta precisión y flexibilidad y permite realizar un rápido muestreo.

Tipos de detectores

Un detector en HPLC está equipado con una pequeña celda de flujo conectada a la salida de la columna que monitorea la concentración del analito.

Los detectores comunes son:

- ✓ Detector UV/Vis
- ✓ Detector de longitud de onda fija o variable
- ✓ Detector de arreglo de diodos para rápido monitoreo
- ✓ Detector de fluorescencia (FI)
- ✓ Detector de índice de refracción (RI)
- ✓ Espectrometría de masas (MS)

Detector UV/VIS

Consiste en una fuente de deuterio y tungsteno que abarca las longitudes de onda en que se pueden ver los

analitos, un monocromador que incluye una grating movible controlada por un motor para seleccionar la longitud de onda adecuada a través del slit. Es el detector más común para HPLC, capaz de detectar nanogramos (ng).

Arreglo de diodos

Posee una celda de flujo que está colocada antes de una grating estacionario y pasa el espectro de luz completo de la fuente de luz. Mide la intensidad espectral de cada longitud de onda, es decir que los registros de espectros nos van ayudan a la determinación de la intensidad de pico y pureza.

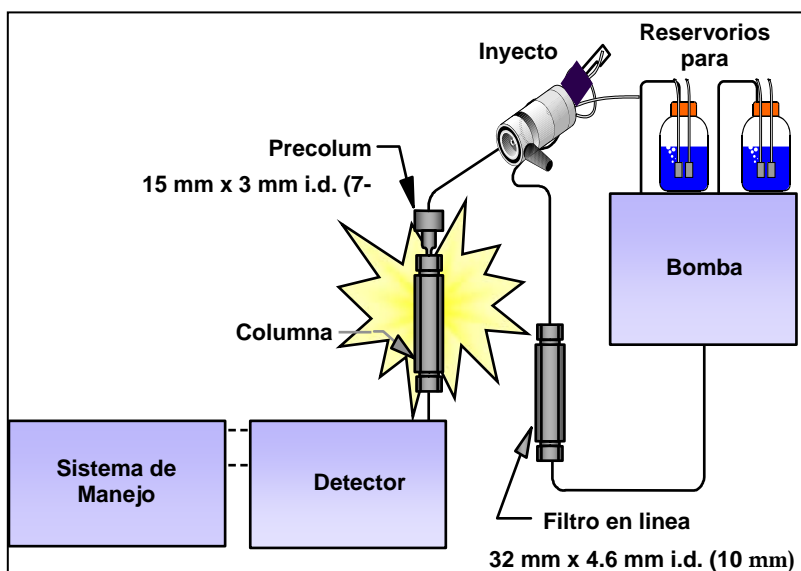


FIGURA 1.10 DIAGRAMA DE CONFIGURACIÓN BÁSICA DE SISTEMA HPLC UV/VIS-DAD

Las fases móviles para HPLC son usualmente una mezcla de uno o más solventes con las siguientes características:

Propiedades físicas deseables para fase móvil

Alta pureza, bajo costo, transparencia ultravioleta, no-corrosiva, baja viscosidad, baja toxicidad, no-inflamable, solubilidad de la muestra.

Modificadores comunes de fase móvil

Buffers

Sirven para estabilizar el pH de la fase móvil en fase reversa y intercambio de iones con ayuda de fosfatos, acetato s y citratos.

Acidificadores

Sirven para suprimir la ionización de analitos ácidos en fase reversa con ayuda de ácidos como el fosfórico y el acético.

Fuerza iónica

Sirve para controlar la elución de analitos iónicos en fase de intercambio iónico con ayuda del cloruro de sodio.

Modificadores Amino

Sirve para reducir tailing de analitos básicos en fase reversa con ayuda de trietilamina.

La bomba envía al solvente a través de las tuberías de diámetro pequeño, hacia la válvula inyectora. Esta consiste en una válvula de varias vías que permite introducir en el flujo de solvente la muestra contenida en un aro o loop de volumen calibrado.

Luego de que se produzca la separación en la columna, los componentes de la mezcla pasan por el detector. Este produce una señal eléctrica proporcional a la cantidad de materia y esa señal es enviada al sistema de manejo de datos que realiza un gráfico de intensidad en función del tiempo llamado cromatograma. Idealmente, se trata de picos gaussianos y cada pico deberá corresponder a un componente de la muestra original.

En general, las condiciones típicas de operación HPLC son:

- ✓ Flujo desde 0.1 a 3.0 ml/min para columnas analíticas y > 5 ml/min para columnas preparativas.
- ✓ Presión de operación entre 500 a 2000 psi.
- ✓ Tamaño de muestra entre 1 a 100 μL

En cuanto a la forma en que se usa el solvente, tenemos el método isocrático y la elución en gradiente.

Método Isocrático: en donde la composición de la fase móvil se mantiene sin cambios durante la corrida

Método de elución de gradiente: en donde la composición de la fase móvil cambia durante la corrida

La temperatura de la columna puede ser a temperatura ambiente hasta 40° C.

1.4.3 Cromatografía de gases (GC)

1.4.3.1. Instrumentación en cromatógrafo de gases

El gas portador o fase móvil (“carrier”), es el que transporta a los compuestos a través de la columna.

Debe ser químicamente inerte, puro (>99%), seco y se aconseja colocar un filtro de carbón activo y una trampa para humedad antes de la entrada del gas al instrumento.

Los más utilizados son helio, nitrógeno, hidrógeno o una mezcla argón con 5 % de metano.

Con ciertos tipos de columnas y detectores, se requiere el uso de un gas de complemento en el detector (“make-up”), el cual es un gas de arrastre adicionado al efluente de la columna antes de que pase al detector.

Columna

La decisión más importante en la fijación de los parámetros para un análisis por cromatografía gaseosa, es la selección de la mejor columna. La otra decisión importante es la selección de la temperatura de la columna, pero se trata de una decisión menos crítica debido a la amplia posibilidad de programaciones que se pueden seleccionar y ensayar.

Inicialmente se utilizaron columnas empacadas. Actualmente, y para la mayor parte de las aplicaciones de la cromatografía gaseosa, se prefiere utilizar columnas capilares que permiten obtener una resolución muy elevada.

Empacadas o rellenas

Las dimensiones de una columna empacada (figura 11) oscilan entre: 2 y 4.6 mm de diámetro interno y de 1/8 a 1/4 de pulgada de diámetro externo. Longitud entre 6 y 30 pies para las más comunes. Soporte sólido (diatomita), de partículas porosas y uniformes, libre de óxidos catalíticos (causan descomposición parcial de la muestra).



FIGURA 1.11 COLUMNA EMPACADA PARA CROMATÓGRAFO DE GASES

Inicialmente las fases estacionarias mas utilizadas para el análisis de mezclas volátiles complejas eran fases polares del tipo poliglicólico como Carbowax. Actualmente han tenido una gran difusión las fases estacionarias apolares del tipo siliconas.

Para muchas aplicaciones la cromatografía gaseosa quiral se ha introducido como una herramienta analítica muy útil, fundamentalmente debido a la excelente capacidad de resolución obtenida con las nuevas columnas capilares. Inicialmente se utilizó como selectores quirales a derivados de aminoácidos (el lauril éster de la N-trifluoroacetil-L-isoleucina).

Las técnicas de cromatografía gaseosa quiral disponibles en la actualidad cubren un amplio espectro de compuestos, utilizando diferentes fenómenos (formación de enlaces de hidrógeno, fases unidas a polisiloxano, fases basadas en la formación de complejo metálicos quirales, fases basadas en efectos de inclusión).



FIGURA 1.12 COLUMNA CAPILAR PARA CROMATÓGRAFO DE GASES

Inyector

En cromatografía de gases, los líquidos se inyectan mediante una jeringa, a través de un disco (septum) de goma, en un inyector caliente que contiene un tubo de vidrio silanizado. El gas portador arrastra la muestra vaporizada desde el inyector a la columna, el volumen de muestra líquida que se inyecta suele ser de 0,1-2 μL . Los productos de descomposición y los componentes no volátiles de la muestra se van acumulando en el tubo de vidrio, que se debe reemplazar periódicamente. Se requieren distintos modos de inyección para diferentes tipos de muestras.

Inyección con división

Si los analitos que interesan constituyen $> 0,1\%$ de la muestra, de ordinario es preferible una **inyección con división** (*split injection*) para introducir la muestra en la columna. En trabajos en que se requiere gran resolución los mejores resultados se obtienen con la mínima cantidad de muestra ($\leq 1\ \mu\text{L}$) que pueda detectarse bien, preferiblemente con $\leq 1\ \text{ng}$ de cada componente. Una inyección total contiene demasiada cantidad de muestra para una columna de un diámetro igual o menor que $0,32\ \text{mm}$. Una inyección con división introduce sólo entre $0,2$ y 2% de muestra en la columna. La temperatura del inyector se mantiene alta, para facilitar una evaporación rápida. Los componentes de punto de ebullición más bajo que se evaporan antes se pueden perder con más probabilidad que los de alto punto de ebullición.

Inyección sin división

Es apropiada para análisis de trazas de analitos que constituyen menos de $0,01\%$ de la muestra. Sin embargo, el tubo interior (guía) es un tubo recto vacío, sin cámara de mezcla. Se inyecta dentro de la guía un volumen grande ($2\ \mu\text{L}$) de disolución diluida en un disolvente de bajo punto de

ebullición, con la válvula de escape cerrada. La temperatura del inyector en la inyección sin división es menor (220 °C) que en la inyección con división, porque la muestra pasa mucho más tiempo en el inyector, y se debe evitar que se descomponga térmicamente la muestra.

Tipos de detectores

Detector de Captura de electrones (ECD)

El detector de captura de electrones ó ECD (electron capture detector) utiliza un emisor beta radioactivo (electrones) para ionizar parte del gas portador y para producir una corriente entre un par de electrodos. Cuando las moléculas orgánicas que contienen grupos funcionales electronegativos, tales como halógenos, fósforo y grupos nitro pasan por el detector, capturan algunos de los electrones y reducen la corriente medida entre los electrodos.

El ECD es uno de los primeros seleccionados en aplicaciones de cromatografía en el medio ambiente debido a su extrema sensibilidad a los compuestos halogenados tales como PCB's pesticidas organoclorados, herbicidas e hidrocarburos halogenados. El ECD es 10-1000 veces más sensible que el FID (Flame Ionization Detector), pero tiene un rango limitado

debido a que su mejor aplicación es en el análisis de compuestos halogenados.

Detector de Ionización de Flama (FID)

Consiste de una flama de hidrógeno-aire y una placa colectora. El efluente de la columna pasa a través de la flama, que ioniza las moléculas orgánicas. El FID es extremadamente sensible y es el detector más ampliamente utilizado, su desventaja es que destruye la muestra.

Empleado para hidrocarburos, poco sensible a compuestos muy oxidados.

Detector de Azufre-Fósforo, FPD Fotométrico de flama

Adaptado para utilizarse con una flama de un FID. Sensible a compuestos con azúfre (394 nm) y con fósforo (526 nm)

Detector de Nitrógeno Fósforo, NPD

Es básicamente el mismo FID, lo que sucede es que se le adiciona un metal alcalino (Rubidio o Cesio), por lo que en algún momento se le llamó (AFID) detector de ionización de flama alcalino, también se le ha llamado detector de ionización (TID), detector termoiónico de flama (FTD), detector específico termoiónico (TSD).

Detector de Espectrometría de Masas, MSD

Es una técnica muy poderosa que permite cuantificar, identificar y da información acerca de la estructura de compuestos desconocidos.

La operación general del espectrómetro de masas es:

- a) Crear iones en fase gaseosa.
- b) Separar los iones en base a su relación.
- c) Medir la cantidad de iones de cada relación.

Una vez ionizadas las moléculas, estas pasan al analizador de iones el cual los transporta hacia el detector. Dentro de los analizadores se puede citar, la trampa de iones, el sector magnético, el tiempo de vuelo, el cuadrupolo, etc.

En la figura 1.13 se muestra un diagrama de configuración básica para cromatógrafo de gases

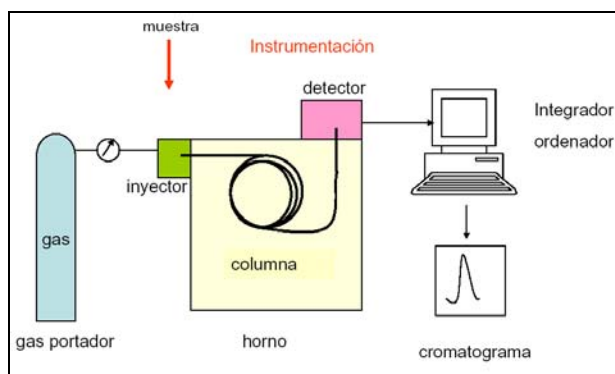


FIGURA 1.13 CONFIGURACIÓN BÁSICA DE CROMATÓGRAFO DE GASES

1.4.4 Cromatografía de permeación de gel

Su fundamento básico consiste en la purificación por exclusión de tamaño usando solventes orgánicos y geles hidrofóbicos en la separación de macromoléculas sintéticas. Se hace pasar una fase móvil a través de una columna que contiene un empaque de gel, poroso y que se caracteriza por el rango o uniformidad (rango de exclusión) del tamaño del poro. En la elección del gel, el rango de exclusión debe ser más grande que el tamaño molecular de las moléculas a separarse. La combinación de los copolímeros divinilbenceno-estireno (SX-3 Bio Beads o equivalentes) resulta específico para nuestro método.

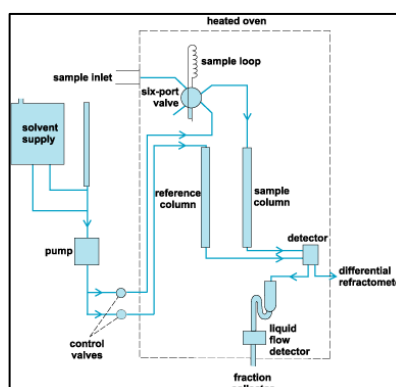


FIGURA 1.14 DIAGRAMA DE CONFIGURACIÓN BÁSICA DE SISTEMA DE PERMEACIÓN DE GEL

En esta cromatografía, la fase estacionaria consiste en largos polímeros entrecruzados que forman una red tridimensional porosa. A los fines prácticos, las columnas se empaquetan con pequeñas partículas esféricas formadas por esos polímeros entrecruzados. En consecuencia, estas partículas son porosas, y el tamaño de los poros es tal que algunas moléculas (las demasiado grandes) no podrán ingresar a esos poros, en tanto que otras (las suficientemente pequeñas) podrán pasar libremente. Los poros quedan conectados formando una malla o red, lo cual determina una serie de caminos a ser recorridos por las moléculas que acceden al interior de esta.

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Localización

La presente tesis se llevó a cabo en dos laboratorios de alta prestigio, como lo son el laboratorio de Cromatografía del Instituto de Ciencias Químicas y Ambientales de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), ubicada en el km 30.5 vía perimetral, Campus Gustavo Galindo en la ciudad de Guayaquil, y en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Comisión Ecuatoriana de Energía atómica CEEA, ubicado en la ciudad de Quito.

Ambos laboratorios han desarrollado experiencia durante muchos años tanto en Proyectos de Investigación y en Servicio a Clientes, estableciendo una plataforma analítica de residuos de pesticidas en diferentes matrices, lo que ha servido como línea base para este trabajo.

En el laboratorio de Cromatografía del ICQ-A se llevan a cabo varios proyectos financiados por CICYT-ESPOL, CONESUP y SENACYT, entre los cuales destacan: **Proyecto Semilla** “Implementación de una metodología de análisis mediante técnicas cromatográficas para determinar residuos de pesticidas en frutas exportables, de acuerdo a estándares internacionales. Caso Banano y Piña” y **Proyecto Conesup**: “Establecimiento de la residualidad de fungicidas (triazoles y estrobirulinas) en hojas y frutos de banano en dependencia de los ciclos de aplicaciones fitosanitarias”, los cuales han permitido el desarrollo de esta tesis.

2.2 Materiales

2.2.1 Equipos de logística

En ambos laboratorios se dispone de adecuada infraestructura eléctrica (110V y 220V polarizada). Equipos de muestreo, equipos de conservación de muestras, gases, vidriería, equipos de comunicación y de cómputo como Internet, información y personal técnico capacitado.

2.2.2 Equipos de laboratorio

- Cromatógrafo de líquidos o HPLC

Sistema de detección UV-VIS con arreglo de diodos (DAD)

Columna C18 Hypersil Gold marca termo, dimensiones 150x4mm, tamaño de partícula 5 (μm)

Bomba cuaternaria y desgasificador

Sistema de manejo de datos Chromquest para información tridimensional

- Cromatógrafo de gases o GC

Sistema de detección de captura de electrones de micro celda (μ ECD)

Columna capilar no polar 50m longitud x 0.22 mm ID- BPX5 x 0.25 μm

Sistema de manejos de datos ChemStation para obtención de resultados

- Computadoras e impresoras

- Balanza analítica con Calibración INEN

- Micro Balanza con Calibración INEN

- Estufa

- Centrífuga Universal GCA Precision Scientific

- Bomba de vacío

- Baño de ultrasonido BRANSON 1510

- Sistema GPC (Cromatografía de permeación de gel) para clean up

- Sistema de concentración con nitrógeno

- Materiales de vidrio pirex grado A
- Consumibles (Jeringas, viales, membranas para filtrar fase acuosa y orgánica)

2.2.3 Reactivos

- Acetona
- Diclorometano
- Hexano
- Acetonitrilo
- Sulfato de sodio anhidro
- Etil acetato
- Gas nitrógeno
- Ciclo hexano

2.2.4 Estándar o patrones

- Carbendazim
- Thiabendazole
- Bitertanol
- Azoxistrobin
- Difenoconazole
- Propiconazole
- Imazalil

- Trifloxistrobin
- Surrogate: PCB 198

2.3 Metodología

Las fases metodológicas principales para el desarrollo de esta tesis incluye: selección y monitoreo de 3 centros de abastos de banano fresco en la ciudad de Guayaquil, implementación y optimización analítica en el laboratorio, manejo de datos y evaluación de resultados con respecto a estándares internacionales y manejo estadístico si hubieren suficientes datos para su desarrollo.

2.3.1 Selección de centros de abasto de la ciudad Guayaquil

La selección de los centros de abastos fue realizada escogiendo 2 supermercados y 1 mercado popular de la urbe, lugares concurridos por la ciudadanía Guayaquileña para la adquisición de sus alimentos, entre ellos frutas frescas como el banano, usado en la alimentación diaria familiar. Para cada uno de los centro se escogió diferentes ubicaciones, tanto en el norte, centro y sur para tener mayor área de muestreo, todo esto con el objetivo de determinar los residuos de plaguicidas de interés y apuntar hacia la protección de la salud del consumidor.

2.3.2 Determinación de tamaño de muestra

En este sentido se estableció el tamaño de muestra en 9: que incluye el monitoreo de 3 sitios de abastos en 3 días diferentes. Los sitios de abasto incluyen dos cadenas de supermercados y un mercado popular, distribuidos proporcionalmente en la ciudad de Guayaquil.

2.3.3 Muestreo

La toma de muestra se realiza en cada uno de los estantes de los supermercados y en el mercado popular seleccionado, dichos bananos se encontraban listos para ser adquiridos por los consumidores.

Se escogió al azar diferentes clusters (manos) de banano, que luego se mezclaron para formar una muestra compuesta. El mismo procedimiento fue aplicado en todas las unidades muestrales del mercado y los supermercados seleccionados.

Para el centro de abasto 1 se realizó el muestreo en 3 días y 3 zonas diferentes de la misma cadena.

Para el centro de abasto 2 se realizó el mismo procedimiento de

muestreo, en 3 días y 3 zonas diferentes de la misma cadena.

Para el centro de abasto 3 se realizó el mismo procedimiento de muestreo, en 3 días y 3 zonas diferentes de la misma cadena.

2.3.4 Análisis de Laboratorio

2.3.4.1 Tecnologías de análisis

Para el control de plaguicidas, se necesita disponer de métodos de análisis que permitan cuantificar con exactitud bajas concentraciones (mg/kg). La técnica específica para este tipo de análisis es la “Cromatografía”, considerada como un método de alta precisión para separar, aislar e identificar componentes de una mezcla (5). Se emplea extensamente en análisis de derivados de petróleo, aceites esenciales, perfumes, saborizantes, alimentos, sustancias de origen biológico, ácidos grasos, plaguicidas, entre otros.

La complejidad de las estructuras moleculares de los pesticidas y la composición adicional de las matrices en donde se investigan (en este caso banano), hace imposible la utilización de un procedimiento universal

para la determinación de estas sustancias por lo que resulta imprescindible aplicar procedimientos analíticos específicos para cada grupo o familia química y por tipo de muestra.

Las dos técnicas específicas usadas para la determinación de residuos de los plaguicidas de interés son la cromatografía de fase líquida HPLC y cromatografía de fase gaseosa.

La cromatografía HPLC DAD-UV/VIS (cromatografía de fase líquida con arreglo de diodos y fracción ultra violeta y visible, incluye columnas para la separación de los principios activos, detectores con capacidad selectiva de detección, como lo es el antes mencionado detector de arreglo de diodos para determinación de niveles de trazas.

La cromatografía de fase gaseosa GC con captura de electrones (ECD) utiliza un emisor beta radioactivo (electrones) para ionizar partes del gas portador y para producir una corriente entre un par de electrodos. Cuando las moléculas orgánicas que contienen grupos

funcionales tales como halógenos, fósforo y grupos nitro, pasan por el detector, capturan algunos de los electrones y emiten la señal.

2.3.4.2 Método de análisis

Entre diversos métodos analíticos que consultamos, se seleccionaron preliminarmente 2, los cuales fueron elegidos bajo los siguientes criterios:

- Desarrollo de metodologías analíticas que se han aplicado a la matriz en estudio: banano
- Los analitos poseen parecida estructura química, es decir pertenecen a la misma familia
- Estudios y experiencia sobre la determinación de pesticidas con métodos que presentan buenas recuperaciones para los analitos.

Método Brasil: Desarrollado en el Instituto de Adolfo Ruhlz de Sao Paulo, y encaminado a evaluar frutas. Se fundamenta en una extracción con acetona, luego una mezcla de diclorometano: hexano, purificación por centrifugación, fraccionamiento en extractos y la posterior inyección en los diversos sistemas

cromatográficos GC-ECD; GC-NPD; HPLC-UV/VIS; HPLC-Fluorescencia (Apéndice 1).

Método CEEA: Desarrollado en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Comisión Ecuatoriana de Energía Atómica. Este método se basa en una extracción con diclorometano, acetona y hexano, purificación con centrifugación y permeación de gel y su posterior inyección en sistema GC-ECD y HPLC-DAD (Apéndice 2).

Después de algunos ensayos como pruebas de recuperación con cada uno de los métodos, se eligió acertadamente el método CEEA (Comisión Ecuatoriana de Energía Atómica), ya que fue el método que tuvo mejores recuperaciones de pesticidas, quedando establecido éste como método referencial.

La recuperación consiste en aplicar a propósito cantidades y concentraciones conocidas de los plaguicidas en estudio a una muestra de banano orgánico, para luego realizar el procedimiento completo del método.

A continuación se presentan las recuperaciones obtenidas con en método Brasil con las diferentes tecnologías aplicadas:

TABLA 4
PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE PLAGUICIDAS EN BANANO MÉTODO BRASIL. TECNOLOGÍA GC-ECD

Pico	Pesticida	R (%)
1	Imazalil	40.82
2	Trifloxistrobin	29.13
3	Propiconazol	49.60
4	Difenoconazole	88.41
5	Azoxystrobin	54.66

TABLA 5
PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE PLAGUICIDAS EN BANANO MÉTODO BRASIL. TECNOLOGÍA HPLC

Pico	Plaguicida	R (%)
1	Carbendazim	125
2	Thiabendazol	108
3	Bitertanol	64

En las tablas 6 y 7 se presentan los porcentajes de recuperación obtenidos con el método CEEA con las diferentes tecnologías aplicadas:

TABLA 6

**PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE PLAGUICIDAS EN
BANANO MÉTODO CEEA. TECNOLOGÍA GC-ECD**

Pico	Plaguicida	R (%)
1	Imazalil	75.90
2	Trifloxistrobin	84.15
3	Propiconazole	106.07
4	Difenoconazole	81.23
5	Azoxystrobin	78.90

TABLA 7

**PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE PLAGUICIDAS EN
BANANO MÉTODO CEEA. TECNOLOGÍA GC-ECD**

Pico	Plaguicida	R (%)
1	Carbendazim	75.75
2	Thiabendazole	82.38
3	Bitertanol	88.52

Por lo tanto, el método que tuvo mejores porcentajes de recuperación fue el método CEEA, quedando establecido como método referencial.

Dicho método permitió evaluar a 8 plaguicidas por los dos diferentes sistemas cromatográficos, los cuales cumplen diferente acción en el tratamiento fitosanitario el cultivo del banano (tabla 8), quedando establecido el siguiente alcance:

TABLA 8
ALCANCE DE TRABAJO PARA DETERMINACIÓN DE
PLAGUICIDAS SELECCIONADOS

Plaguicidas	Grupo Químico	Usos	Sistema cromatográfico
Carbendazim	Benzimidazol	Fungicida	HPLC-DAD
Thiabendazol	Benzimidazol	Fungicida	HPLC-DAD
Bitertanol	Azol	Fungicida	HPLC-DAD
Azoxystrobin	Estrobirulina	Fungicida	GC-ECD
Trifloxistrobin	Estrobirulina	Fungicida	GC-ECD
Imazalil	Triazol	Fungicida	GC-ECD
Difenoconazol	Triazol	Fungicida	GC-ECD
Propiconazole	Triazol	Fungicida	GC-ECD

2.3.

4.3 Preparación de muestras

El trabajo se dividió entre los dos laboratorios, para HPLC la primera parte que consiste en la extracción y purificación de las muestras se la realizó en el laboratorio CEEA, debido a que dicho laboratorio cuenta con el sistema de cromatografía de permeación de gel, y la segunda y última parte consistente en la inyección de las muestras y determinación de residuos de plaguicidas fue realizado en el Laboratorio de Cromatografía de ICQ-A

ESPOL. En cuanto a las muestras de GC, estas se prepararon y se inyectaron en la Comisión Ecuatoriana de Energía atómica por contar con el cromatógrafo GC-ECD indicado para el análisis.

El método utilizado es de multi-residuos, es decir que bajo la misma preparación se extrae todo el grupo de estos compuestos.

2.3.4.3.1 Descripción del procedimiento de extracción en muestras de banano

1. Pesar 30 g de banano previamente cortado en un vaso de precipitación de 250 mL.



FIGURA 2.15 PESAJE DE MUESTRA BANANO

2. Añadir 60 mL de acetona y agitar con ultraturrax.



FIGURA 2.16 ADICIÓN DE ACETONA A LA MUESTRA

3. Añadir 30 mL de diclorometano y 30 mL de hexano, volver a agitar con ultraturrax hasta que la mezcla presente una característica homogénea.



**FIGURA 2.17 ADICIÓN DE DICLOROMETANO:HEXANO(1:1)
A LA MUESTRA**

4. Filtrar a través de 20 gr de SO_4Na_2 purificado*



**FIGURA 2.18 FILTRACIÓN DE LA MUESTRA BANANO CON
 SO_4Na_2 PURIFICADO***

La purificación consiste en poner SO_4Na_2 en una mufla a 400°C por 5 horas.

5. Recoger la parte semi-sólida en un tubo de centrifuga y centrifugar por 3 minutos a 3000 RPM.

6. Pasar la fase orgánica que se separó de la masa semi-sólida en el balón de 250 ml, y dar un enjuague final con 2 ml de etil acetato aproximadamente.



FIGURA 2.19 RECOLECCIÓN DE FASE ORGÁNICA Y ENJUAGUE FINAL CON ETIL ACETATO

7. Concentrar en rotaevaporador hasta un volumen de 5 ml aproximadamente



FIGURA 2.20 CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA BANANO CON ROTAEVAPORADOR

8. Transferir a un tubo cónico y concentrar con nitrógeno



FIGURA 2.21 CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA CON NITRÓGENO

2.3.4.3.2 Descripción del procedimiento de purificación o

clean up en muestras de banano

- 1.-Filtrar a través de un filtro de $0,45\ \mu\text{m}$ para garantizar que no haya ninguna partícula que pueda causar obstrucción en la columna de permeación de gel.
- 2.-Inyectar $500\ \mu\text{l}$ del extracto en la columna de permeación de gel (GPC).
- 3.-Recoger la fracción que va desde el minuto 15 al minuto 30.
- 4.-Concentrar en rotaevaporador hasta tener un volumen de 5 ml.
- 5.-Concentrar con nitrógeno a flujo bajo hasta obtener un volumen final de 1 ml.
- 6.-Después, ese volumen final de 1 ml se debe dividir en 2 partes, quedando 0,5 ml para ser inyectados directamente en GC-ECD, lo que no sucede en HPLC, puesto que los 0,5 ml restantes deben ser concentrados

con nitrógeno hasta casi sequedad y agregar 1 ml de acetonitrilo para que puedan ser inyectados en el cromatógrafo HPLC.

7.-Inyectar los extractos en los sistemas correspondientes.

2.3.4.4 Protocolo para la implementación del método analítico

Se contó con un protocolo analítico que nos ayudó a determinar que nuestro método de análisis es funcional a las condiciones del laboratorio y a las sensibilidades requeridas, por lo que se evaluaron varios parámetros descritos a continuación.

- **Linealidad**

Comprende el trabajo con patrones o estándares, los cuales están certificados de marca Dr. Ehresntorfer y Supelco. Se prepararon las siguientes soluciones madres (tabla 9):

TABLA 9
CONCENTRACIÓN DE SOLUCIONES MADRES Y
SOLVENTES USADOS EN LA PREPARACIÓN DE DICHAS
SOLUCIONES

Plaguicidas	Concentración de la solución madre (ppm)	Solvente en que se encuentra disuelto
Carbendazim	400	Acetona
Thiabendazole	236	Etil Acetato
Bitertanol	408	Acetona
Azoxystrobin	408	Etil acetato
Trifloxistrobin	536	Etil acetato
Imazalil	448	Etil acetato
Difenoconazole	476	Etil acetato
Propiconazole	532	Etil acetato

A partir de éstas se prepararon soluciones individuales desde 20 ppm hasta 0.05 ppm y en mezclas.

Los patrones fueron ensayados hasta conseguir una buena separación y resolución de picos, consiguiendo las condiciones óptimas de operación del equipo. Una vez identificados los plaguicidas seleccionados se prepararon e inyectaron las disoluciones de estos en 6 distintos niveles para la curva de calibración, se hicieron los respectivos cálculos (Apéndices 3, 4 y 5), exponiendo los resultados en las tablas 10 y 11:

TABLA 10

**NIVELES DE CONCENTRACIÓN PARA MIX HPLC
(CARBENDAZIM, THIABENDAZOLE Y BITERTANOL)**

Nivel	Plaguicidas	Concentración (mg/kg)
1	Mix Hplc	10
2	Mix Hplc	8
3	Mix Hplc	4
4	Mix Hplc	2
5	Mix Hplc	1
6	Mix Hplc	0.5

TABLA 11

**NIVELES DE CONCENTRACIÓN PARA MIX GC
(AZOXYSTROBIN, PROPICONAZOLE, DIFENOCONAZOLE
Y TRIFLOXISTROBIN)**

Nivel	Plaguicidas	Concentración (mg/kg)
1	Azoxystrobin, Propiconazole, Difenoconazole Trifloxistrobin	0.24 0.12 0.53 0.05
2	Azoxystrobin, Propiconazole, Difenoconazole Trifloxistrobin	0.49 0.39 1.01 0.12
3	Azoxystrobin, Propiconazole, Difenoconazole Trifloxistrobin	1.03 0.81 2.01 0.49
4	Azoxystrobin, Propiconazole, Difenoconazole Trifloxistrobin	1.00 1.00 2.90 1.00
5	Azoxystrobin, Propiconazole, Difenoconazole Trifloxistrobin	2.00 1.50 3.80 1.50
6	Azoxystrobin, Propiconazole, Difenoconazole Trifloxistrobin	2.40 2.00 5.70 2.00

Se decidió inyectar el imazalil individualmente en GC-ECD, ya que el software del computador al momento de dibujar los picos, se guía por la altura del pico máximo, y como el imazalil resulta bastante alto, si lo pusiéramos junto a los demás, los otros se harían pequeños y se haría difícil su observación.

Los niveles de concentración para el imazalil quedaron de la siguiente forma (tabla 12):

**TABLA 12
NIVELES DE CONCENTRACIÓN PARA IMAZALIL
INDIVIDUAL**

Nivel	Plaguicidas	Concentración (mg/kg)
1	Imazalil	4
2	Imazalil	8
3	Imazalil	12
4	Imazalil	16
5	Imazalil	20
6	Imazalil	25

Con esos datos se obtuvieron las curvas de calibración. Las curvas de calibración son curvas bastante útiles que dan una respuesta de la calibración de un instrumento ya que permiten evaluar la linealidad de la respuesta del equipo y establecer el rango de trabajo donde el equipo funciona de manera óptima. Para cada uno de nuestros plaguicidas el índice de linealidad de cada curva de calibración debe estar por encima de 0.98 (2).

- **Porcentaje de recuperación**

Para calcular el porcentaje de recuperación se hace la fortificación de muestras de bananos reales (ya sea blanco u orgánico), lo cual consiste en añadir un mix de patrones en concentraciones conocidas a dichas muestras. Una vez que se hizo la fortificación, se realizó por completo el procedimiento de análisis y se evaluó el resultado con respecto a la concentración del patrón que se estima encontrar en el extracto de muestra fortificada, estableciéndose en qué porcentaje se recupera. El porcentaje de recuperación aceptado se encuentra en el rango de 70 a 110% (2).

- **Repetibilidad**

La repetibilidad es un parámetro que refleja la precisión de un método, cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones utilizando la misma muestra, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante una misma sesión de trabajo en un periodo corto.

El parámetro estadístico que caracteriza a estos dos parámetros son la desviación estándar o preferiblemente el coeficiente de variación (desviación estándar relativa o CV), el cual se considera no debe ser mayor de un 15%(2).

Se evaluó repetibilidad en patrones inyectando 3 veces el mismo nivel.

- **Límite de Detección y Límite de Cuantificación**

El límite de detección es la concentración mínima del analito que puede ser detectada por un método analítico determinado, mientras que el límite de cuantificación es la cantidad o concentración del analito a partir de la cual es confiable realizar determinaciones cuantitativas.

Para determinar el límite de detección se utiliza el patrón de la menor concentración visible en el equipo, para este caso se escogió 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para mix HPLC, 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para Trifloxistrobin, 0.12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para propiconazole, 0.53 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para difenoconazole, 0.24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para azoxystrobin y 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para imazalil.

El límite de cuantificación será 3.3 veces el límite de detección y se expresa en mg/kg .

2.3.4.5 Inyecciones y cuantificación de muestras

Una vez realizadas las pruebas anteriores se procedió a la preparación de las 9 muestras de banano para obtener los extractos que son inyectados en ambos equipos cromatográficos. Con los datos de área obtenidos se realizó

la cuantificación utilizando para cada uno de ellos la ecuación que se originó de los cálculos de la curva de calibración, esto es, si se encuentra plaguicida en las muestras evaluadas.

2.3.5 Análisis Estadístico

El tamaño de muestra determinado fue de 9, las cuales se seleccionaron proporcionalmente de acuerdo a los lugares de abastecimiento de la fruta, quedando 3 muestras escogidas al azar por cada centro de abasto. Los pesticidas evaluados fueron 8 (carbendazim, thiabendazole, bitertanol, azoxystrobin, trifloxistrobin, imazalil, difenoconazole y propiconazole).

Para evaluar los resultados de los análisis de residuos de pesticidas en los 3 centros de abastos se pretendía utilizar la tabla ANOVA, el cual es un modelo estadístico que realiza un análisis de varianza para comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. La tabla ANOVA solo podrá utilizada si hay suficiente información de cantidades de plaguicidas; de suceder lo contrario y de que las muestras no presenten cantidades considerables de los plaguicidas o no presentan nada de

plaguicidas, esta herramienta estadística no podrá ser utilizada por falta de información.

2.3.6 Análisis de Seguridad Alimentaria

Los Límites Máximos de Residuos (LMR), establecidos por el Codex Alimentarius para cada pesticida de estudio, permitirán aceptar o rechazar una muestra con respecto a Seguridad Alimentaria (5). Si los valores detectados en las muestras monitoreadas sobrepasan los LMR, será calificada como perjudicial para el consumidor y si los niveles están por debajo será calificada como aceptable. Si en la muestra no se detecta ningún plaguicida será calificada como libre de plaguicidas, sin que signifique que sea orgánica, sino que no ha sido afectada por el uso de plaguicidas durante su cultivo.

CAPÍTULO 3

3. ANALISIS DE RESULTADOS

La metodología implementada y optimizada se dividió en dos partes fundamentales, que fueron: trabajo de campo y trabajo de laboratorio. En el trabajo de campo se estableció y aplicó un diseño de muestreo y en el trabajo de laboratorio se implementó una metodología de análisis químico para la determinación de un grupo de plaguicidas que atacan al cultivo de banano y que de permanecer en el alimento podrían representar un gran peligro para la salud. Los resultados de las muestras fueron comparados con los estándares de *Codex alimentarius* (LMR o Límites Máximos de Residuos Permitidos). De acuerdo a los puntos mencionados anteriormente se obtuvieron los siguientes resultados:

3.1 Implementación y optimización de una metodología analítica

3.1.1 Selección del método de análisis y alcance

La técnica específica para análisis de residuos de plaguicidas es la cromatografía, para lo cual se utilizó cromatografía gaseosa y cromatografía líquida. El método analítico referencial seleccionado para este trabajo, fue el método CEEA, encaminado al análisis de residuos de plaguicidas en frutas como el banano, entre los cuales están los plaguicidas seleccionados para este estudio. El método implementado permite evaluar ocho plaguicidas que cumplen diferente acción en el tratamiento fitosanitario del banano, quedando establecido el siguiente alcance:

TABLA 13

ALCANCE DE MÉTODO SELECCIONADO

Plaguicidas	Grupo Químico	Usos	Tecnología
Carbendazim	Benzimidazol	Fungicida	HPLC-DAD
Thiabendazole	Benzimidazol	Fungicida	HPLC-DAD
Bitertanol	Azol	Fungicida	HPLC-DAD
Azoxystrobin	Estrobirulina	Fungicida	GC-ECD
Trifloxistrobin	Estrobirulina	Fungicida	GC-ECD
Imazalil	Triazol	Fungicida	GC-ECD
Difenoconazole	Triazol	Fungicida	GC-ECD
Propiconazole	Triazol	Fungicida	GC-ECD

3.1.2 Condiciones cromatográficas e identificación de pesticidas

Se inyectaron los patrones certificados en forma individual para conseguir las mejores condiciones en que los analitos se ven claramente en el cromatograma, quedando establecidas las siguientes condiciones cromatográficas para identificarlos, las cuales se presentan en las tablas 14 y 15 junto con la configuración básica de los equipos utilizados (figuras 3.22 y 3.23).

TABLA 14

**CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS ESTABLECIDAS
PARA PLAGUICIDAS QUE SE DETERMINAN POR GC-ECD**

Detector:	Captura de electrónica de micro celda (μ ECD) a 320 °C			
Inyector:	Automático de líquidos 7683.Split/Splitless a 260 °C			
Columna:	Capilar BPX- 5 (No polar) Temperatura máxima: 370 °C Longitud 50 m Diámetro interno: 0.22 mm			
Temperatura de horno:	Temperatura Inicial	Tiempo Inicial(min)	Rampa	Temperatura Final
	160 °C	1.00	10°C/min.	230°C
	230°C	0.00	20°C/min	270°C
	270°C	10.00	10°C/min	290°C
	290°C	24	0.0 °C/min	

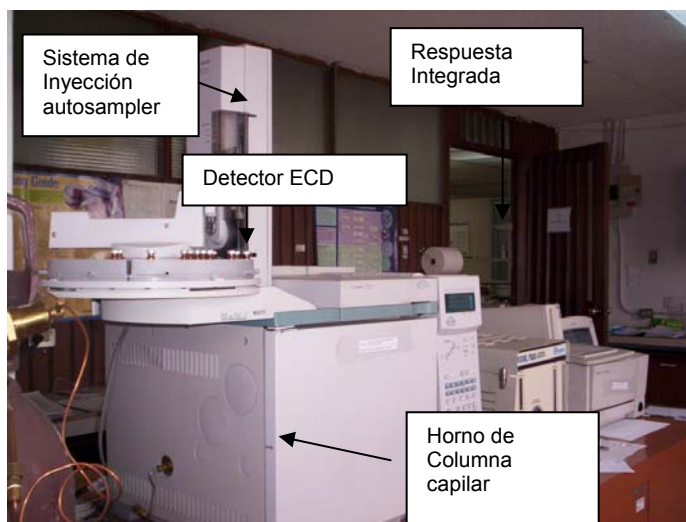


FIGURA 3.22 CONFIGURACIÓN BÁSICA DE SISTEMA GC-ECD. LABORATORIO DE COMISIÓN ECUATORIANA DE ENERGÍA ATÓMICA

TABLA 15

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS ESTABLECIDAS PARA PLAGUICIDAS QUE SE DETERMINAN POR HPLC-DAD

Equipo:	Cromatógrafo de fase líquida Spectra System		
Columna:	Hypersil Gold C18 Columna, marca termo Dimensiones: 150x4mm Tamaño de partícula: 5 μ m		
Detector:	UV-Vis con Arreglo de diodos DAD		
Flujo	1,1 ml/min		
Fase móvil	Tiempo Inicial (min)	Acetonitrilo(%)	Agua(%)
	0	85	15
	3	85	15
	9	30	70
	11	30	70
	12	75	25
	15	75	25

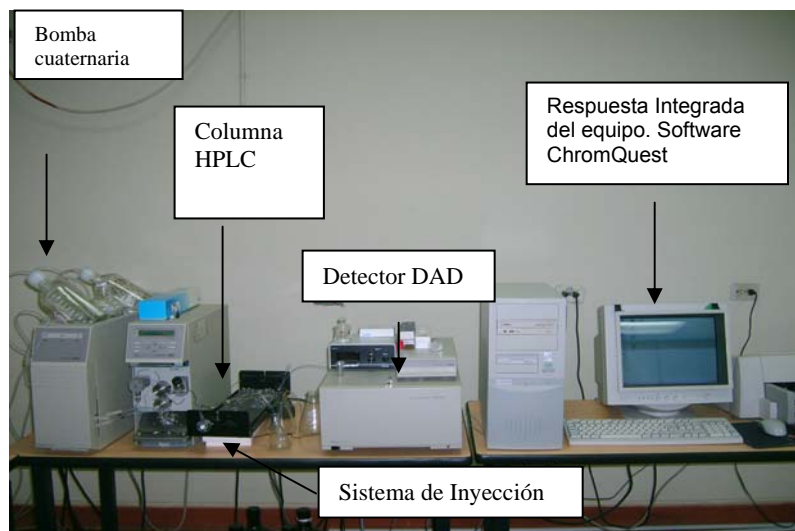


FIGURA 3.23. CONFIGURACIÓN BÁSICA DE SISTEMA HPLC-UV-VIS/DAD. LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA ICQA-ESPOL

La identificación de los plaguicidas se obtuvo en base al tiempo de retención (TR), que es el tiempo transcurrido entre el instante en que se inyecta la muestra y el instante en que se detecta la señal propia del componente, es decir cuando los compuestos eluyen de la columna cromatográfica. El tiempo de retención va a depender de la compatibilidad de cada compuesto con la fase estacionaria de la columna, obteniéndose los siguientes perfiles cromatográficos de la mezcla de patrones. Como se aprecia en las siguientes figuras, cada plaguicida determinado por HPLC-DAD muestra un pico, y en el caso del sistema GC-ECD muestran también un pico excepto el propiconazole y difenoconazole.

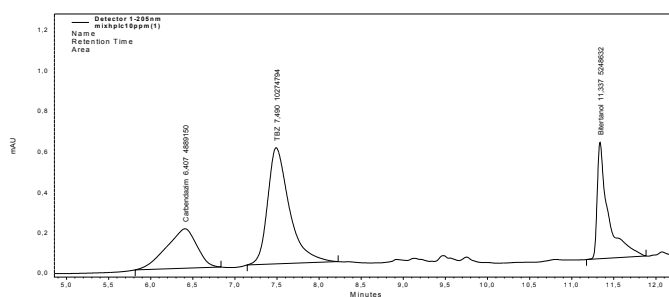


FIGURA 3.24 PERFIL CROMATOGRÁFICO DE MIX DE PATRONES DE PLAGUICIDAS DETERMINADOS POR HPLC

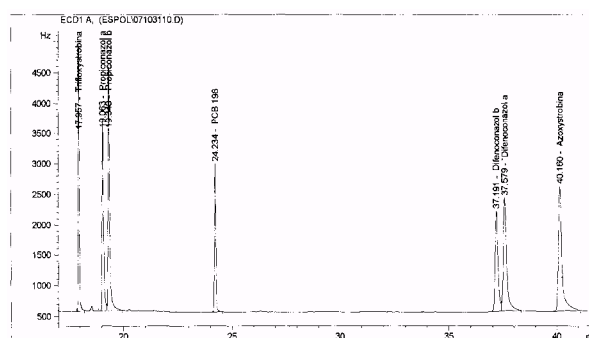


FIGURA 3.25 PERFIL CROMATOGRÁFICO DE MIX DE PATRONES DE PLAGUICIDAS DETERMINADOS POR GC

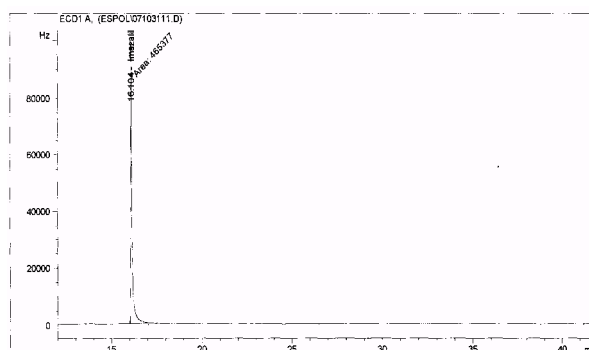


FIGURA 3.26 PERFIL CROMATOGRÁFICO IMAZALIL

Como se indicó anteriormente cada compuesto eluye de la columna a distintos tiempos, estos se denominan tiempos de

retención o TR (5). Los tiempos de retención para los compuestos en estudio quedaron de la siguiente manera.

TABLA 16
TIEMPO ESTIMADO DE RETENCIÓN DE PLAGUICIDAS DETERMINADOS POR HPLC Y GC-ECD

Pico	Plaguicida	T Retención (min)
HPLC-DAD		
1	Carbendazim	6.407
2	Thiabendazole	7.490
3	Bitertanol	11.337
GC-ECD		
4	Trifloxistrobin	17.957
5	Propiconazole A y B	19.063
		19.340
6	Difenoconazole A y B	37.191
		37.579
7	Azoxystrobin	40.160
8	Imazalil	16.104

Linealidad y curvas de calibración

Para estimar el coeficiente de linealidad de la respuesta cromatográfica se estudiaron diferentes intervalos de concentración, incluyendo 6 puntos en la curva de calibración. Se determinaron los índices de linealidad (R^2) o coeficientes de correlación para cada compuesto, tal como se detalla en la tabla 17. Todos estos índices estuvieron por encima de 0,98. De esta manera se confirma la respuesta lineal del equipo para cada uno de los compuestos. Desde el apéndice 6 hasta el

apéndice 13 se muestran las curvas de calibración obtenidas para cada compuesto con sus ecuaciones, que se pueden utilizar en la cuantificación.

TABLA 17
ÍNDICES DE LINEALIDAD (R²)

Plaguicidas en estudio	R²
Carbendazim	0.990
Thiabendazole	0.999
Bitertanol	0.996
Trifloxistrobin	0.995
Propiconazole	0.997
	0.993
Difenoconazole	0.995
	0.996
Azoxystrobin	0.996
Imazalil	0.999

3.1.4 Porcentaje de recuperación

Es una de las pruebas más importantes, porque se trabaja sobre la matriz en estudio (5), en este caso el banano. Lo que se hace es agregar a propósito una cantidad conocida de patrones de los pesticidas seleccionados en concentraciones conocidas y cercanas a lo que se espera encontrar. Esta prueba permitió evaluar la manera en que se comporta cada plaguicida en el banano; así como etapa de extracción y purificación con respecto a calidad y cantidades de solvente.

Los valores de área de pico registrados por ambos sistemas para cada compuesto, son comparados con los valores de área del patrón utilizado. Luego se estima el porcentaje en que se recupera después de aplicar toda la metodología de análisis. Los valores aceptados van de 70 al 110% (2). Las recuperaciones estimadas para los ocho pesticidas se presentan en el tabla 18 y un ejemplo del cálculo se encontrará en el apéndice 14.

TABLA 18
PORCENTAJES FINALES ESTIMADOS DE PLAGUICIDAS
EN MUESTRAS DE BANANO

Plaguicidas	Porcentaje de recuperación(%)
Carbendazim	75.75
Thiabendazole	82.38
Bitertanol	88.52
Trifloxistrobin	84.15
Propiconazole	106.07
Difenoconazole	81.23
Azoxystrobin	78.90
Imazalil	75.92

3.1.5 Repetibilidad

Esta prueba se obtiene realizando inyecciones el mismo día. La desviación estándar y el coeficiente de variación, son dos parámetros muy indicativos de la variabilidad absoluta y relativa. Como valor de referencia del coeficiente de variación

se considera que no debe ser mayor de un 15 % (2).

Para repetibilidad se trabajó con inyecciones en 6 diferentes niveles de concentración de los mix de estándares, tanto para HPLC como para GC inyectadas 3 veces el mismo día. Como se mencionó anteriormente, un dato relevante para repetibilidad es el coeficiente de variación, el cual no debe ser mayor al 15% para considerar que hay una buena repetibilidad, por lo tanto se mostrará este parámetro en las siguientes tablas para cada uno de los niveles de concentración respecto al área y tiempo de retención.

TABLA 19

COEFICIENTE DE VARIACIÓN ESTIMADO DE AREA EN SOLUCIONES PATRONES INYECTADAS POR TECNOLOGÍA HPLC-DAD

Pico	Plaguicida	CV (%) Área					
		Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5	Nivel 6
1	Carbendazim	6.93	1.51	2.84	3.02	1.92	1.32
2	Thiabendazole	8.18	5.26	4.94	3.83	2.80	0.94
3	Bitertanol	5.24	5.05	3.81	1.29	0.43	2.04

TABLA 20

**COEFICIENTE DE VARIACIÓN ESTIMADO DE AREA EN
SOLUCIONES PATRONES INYECTADAS POR
TECNOLOGÍA GC-ECD**

Pico	Plaguicida	CV(%) Área					
		Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5	Nivel 6
1	Trifloxistrobin	3	8.35	1.44	2.89	0.26	0.87
2	Propiconazole	6.45	7.55	2.75	2.65	1.6	2.85
3	Difenoconazole	4.9	3.05	3.95	2.38	7.5	2.35
4	Azoxystrobin	8.5	5.01	2.32	2.81	2.18	2.73
5	Imazalil	9.85	5.22	6.79	6.48	5.07	9.71

TABLA 21

**COEFICIENTE DE VARIACIÓN ESTIMADO DE TIEMPOS DE
RETENCION EN SOLUCIONES PATRONES INYECTADAS
POR TECNOLOGÍA HPLC-DAD**

Pico	Plaguicida	CV(%) Tiempo de retención					
		Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5	Nivel 6
1	Carbendazim	0.29	2	0.22	0.64	0.84	0.36
2	Thiabendazole	0.18	0.68	0.10	0.09	0.37	0.37
3	Bitertanol	0.05	0.15	0.07	0.05	0.11	0,.12

TABLA 22

**COEFICIENTE DE VARIACIÓN ESTIMADO DE TIEMPOS DE
RETENCION EN SOLUCIONES PATRONES INYECTADAS
POR TECNOLOGÍA GC-ECD**

Pico	Plaguicida	CV(%) Tiempo de retención					
		Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5	Nivel 6
1	Trifloxistrobin	0.28	0.13	0.06	0.05	0.01	0.01
2	Propiconazole	0.21	3	0.05	0.03	0.03	0.01
3	Difenoconazole	0.13	0.09	0.05	0.05	0.04	0.02
4	Azoxystrobin	0.16	0.10	0.05	0.07	0.06	0.03
5	Imazalil	0.36	0.03	0.34	0.04	0	0.01

3.1.6 Límite de detección y límite de cuantificación

Para determinar el límite de detección se utiliza el patrón de menor concentración visible en el equipo, por lo utilizamos el nivel 1 de cada plaguicida. El límite de cuantificación, por otro lado, es 3.3 veces más que el límite de detección. Para la determinación de estas características se escogió 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para mix HPLC, 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para trifloxistrobin, 0.12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para propiconazole, 0.53 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para difenoconazole, 0.24 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para azoxystrobin y 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para imazalil.

TABLA 23

LIMITE ESTIMADO DE DETECCIÓN (LD) Y CUANTIFICACIÓN (LC) PARA MIX HPLC

Plaguicida	LD ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	LC (mg/kg)
Carbendazim	0.11	0.048
Thiabendazole	0.018	0.008
Bitertanol	0.013	0.006

TABLA 24

LIMITE ESTIMADO DE DETECCIÓN (LD) Y CUANTIFICACIÓN (LC) PARA MIX GC E IMAZALIL

Plaguicida	LD ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	LC (mg/kg)
Trifloxistrobin	0.15	0.06
Propiconazole	0.047	0.02
Difenoconazole	0.10	0.04
Azoxystrobin	0.41	0.18
Imazalil	0.17	0.08

Como podemos apreciar, los límites de cuantificación (LC) se encuentran por debajo de los Límites de Residuos Máximos Permitidos.

3.2 Monitoreo de los principales centros de abasto de la ciudad de Guayaquil

Se tienen 9 muestras representativas de banano ecuatoriano de los 3 diferentes centros de abastos seleccionados para realizar el análisis de plaguicidas. Del centro de abasto 1 y 2 se tomó 3 muestras representativas por cada uno de distintas sucursales de los centros de abastos. En el centro de abasto 3 que es un mercado concurrido de la ciudad se procedió a coger muestras de bananos de diferentes vendedores 3 diferentes días. Los cromatogramas obtenidos de las 9 muestras por ambos sistemas se exponen en los apéndices 15-23.

En la siguiente página se presentan los resultados obtenidos de las 9 muestras evaluadas:

TABLA 25

RESULTADOS DE ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN MUESTRAS DE BANANO

	Thiabendazole	Carbendazim	Bitertanol	Azoxystrobin	Trifloxistrobin	Imazalil	Difenoconazole	Propiconazole
LMR	5	0.2	0.05	-	0.05	2	-	0,1
LC	0.008	0.048	0.006	0.18	0.06	0.08	0.04	0.02
S1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S3	0.082	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C1	nd	nd	nd	nd	nd	0.08	nd	nd
C2	nd	nd	nd	nd	nd	0.15	nd	nd
C3	nd	nd	nd	nd	nd	0.13	nd	nd
M1	nd	nd	nd	nd	nd	0.08	nd	nd
M2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
M3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

LMR: Límite máximo de residuos (mg/kg)

nd: no detectado

LC: Límite de cuantificación

■ Centro de abasto (Supermercado 1)

■ Centro de abasto 2 (Supermercado 2)

■ Centro de abasto 3 (Mercado)

De las 9 muestras evaluadas, 4 muestran el resultado de no detectado para los 8 plaguicidas en estudio, lo que representa que están por debajo del límite de cuantificación. Ahora, de los 8 plaguicidas evaluados, se evidencia presencia de thiabendazole en una muestra, e imazalil en 4 muestras. Se puede apreciar que los

datos obtenidos están muy por debajo del límite máximo de residuos (LMR) establecidos por el Codex Alimentarius

3.3 Evaluación de resultados de residualidad de plaguicidas en banano, con respecto a los estándares internacionales de Seguridad Alimentaria establecidos por el Codex Alimentarius.

Los extractos fueron obtenidos aplicando el procedimiento completo del método, para después ser inyectados en ambos sistemas cromatográficos bajo las condiciones implementadas para obtener las áreas de los picos y poder cuantificar de esta forma a los plaguicidas si es que se encontrara algo de residuos de plaguicida.

Al observar los límites máximos de residuos para plaguicidas establecidos por el Codex Alimentarius, nos damos cuenta que los pocos resultados que obtuvimos están por debajo de ellos, por lo que de manera general se podría decir que las 9 muestras evaluadas están **“Libre de Residuos de Plaguicidas”**, con respecto a carbendazim, thiabendazole, bitertanol, azoxystrobin, trifloxistrobin, difenoconazole, propiconazole e imazalil.

Se evidencia que todas las muestras procedentes de un mismo centro de abasto contienen imazalil, pero todas están por debajo del límite máximo de residuos, por lo que se consideran libre de

plaguicidas. De las muestras evaluadas, el compuesto que más se repite es el imazalil.

A continuación se muestran algunas figuras explicativas de los resultados:

FIGURA 3.27 NÚMERO DE PLAGUICIDAS ENCONTRADOS EN CENTROS DE ABASTO

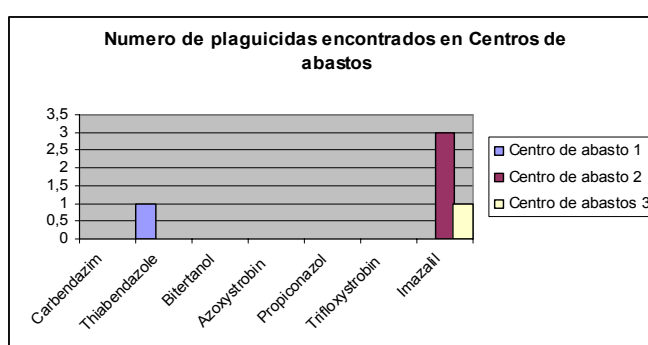


FIGURA 3.28 CONCENTRACIÓN DE IMAZALIL EN CENTRO DE ABASTO 2

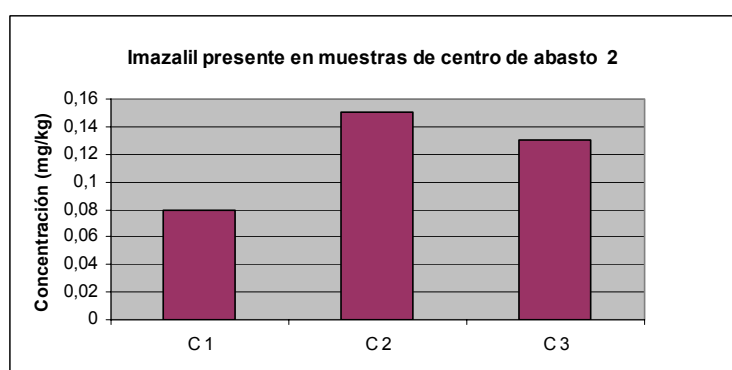
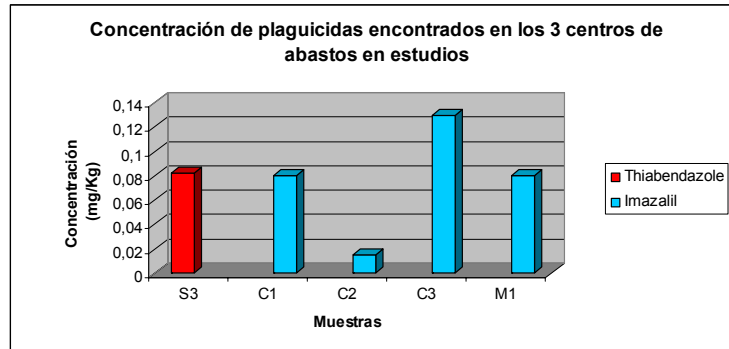


FIGURA 3.29 CONCENTRACION DE PLAGUICIDAS ENCONTRADOS EN LOS 3 CENTROS DE ABASTO



CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- Esta tesis Implementó y optimizó un método multiresidual de plaguicidas (carbendazim, thiabendazole, bitertanol, azoxystrobin, trifloxistrobin, imazalil, difenoconazole y propiconazole), mediante tecnologías de cromatografía de gases con detección de captura de electrones (GC-ECD) y cromatografía de líquidos con detección de arreglo de diodos (HPLC-DAD).
- Con respecto a la implementación del método analítico, cabe destacar que este método involucra una sola etapa preparativa y dos configuraciones analíticas (GC y HPLC), característico de los sistemas analíticos a nivel de trazas y ultra-trazas. Los indicadores como Repetibilidad (% CV) y Coeficiente de Correlación (R^2) estuvieron en los promedio de 0.25-3.88 % y 0.9957

respectivamente para ambas configuraciones cromatográficas. Estos indicadores considerados muy aceptables, permiten asegurar la confiabilidad de los resultados, sobre todo en temas tan sensibles como “Residualidad de Plaguicidas”.

- Se logró establecer que, de las 9 muestras de banano, monitoreadas y evaluadas, 5 reportaron residuos de plaguicidas pero muy por debajo de los Límites Máximos de Residuos establecidos por el Codex Alimentarius. Esto permite garantizar la salud de consumidor e incentivar el consumo de la fruta por sus cualidades nutritivas y mejorar nuestros hábitos alimenticios y motivar a la industria alimenticia ecuatoriana al desarrollo de productos a base de banano.

- Queda fortalecida la capacidad técnica para el análisis de residuos de plaguicidas, ya que pocos profesionales dominan una técnica analítica fina como lo es la cromatografía a nivel de trazas y ultra-trazas.

RECOMENDACIONES

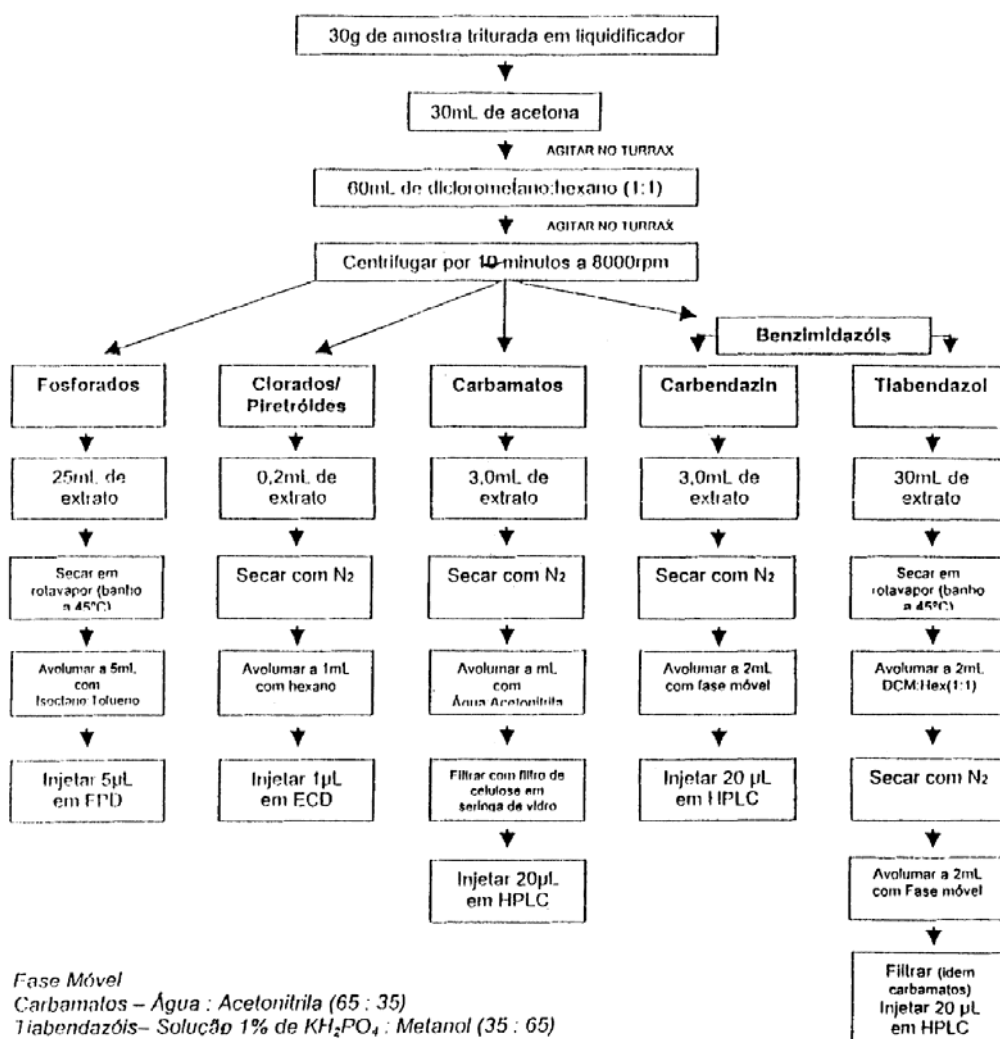
- Las muestras analizadas en su mayoría han reportado el resultado de no detectado (nd), sin embargo estos resultados podrían ser confirmados con análisis de laboratorios certificados, ya sea dentro o fuera del país. En lo que respecta a las 5 muestras que presentaron pequeñas cantidades de plaguicidas, están por debajo del límite máximo de residuos por lo que podremos inferir que son seguras para el consumo humano y no presentan efectos tóxicos a la salud.
- Realizar una validación del método implementado y optimizado con el objeto de asegurar la exactitud de los resultados obtenidos, proporcionando confianza y seguridad a todas las partes interesadas.
- Son pocos los estudios de seguridad alimentaria para el consumidor interno, pues la atención se centra en el producto que se exporta y que hay de la salud y la nutrición de los ecuatorianos. Por eso es necesario que se ponga todo el esfuerzo posible para fortalecer la capacidad científica y tecnológica local y realizar más estudios de esta índole que permitan dar un paso hacia delante en lo que respecta a ciencia y tecnología.

BIBLIOGRAFIA

1. SICA, 2004. EL SECTOR BANANERO ECUATORIANO UNA VISION INTEGRAL. El rol del sector bananero en la economía. www.sica.gov.ec/cadenas/banano/docs/informe2.html
2. ZAMORA TATIANA, 2004. Determinación de residuos de fungicidas en productos vegetales mediante técnicas cromatográficas avanzadas. Tesis Doctoral, Universidad Jaume I, Castellón, España.
3. COSCOLLÁ, R. 2003; El control de los residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas frescas, Seminario: Plaguicidas seguridad alimentaria en frutas y hortalizas problemas y alternativas, UIMP, Valencia.
4. FAO 2, 2004. LIMITES DE RESIDUOS PERMITIDO CODEX ALIMENTARIUS. www.faostat.fao.org/faostat/pestdes .
5. RESABALA, C.; Evaluación de la banana ecuatoriana de acuerdo con estándares internacionales de seguridad alimentaria para garantizar su certificación y fortaleza competitiva. Tesis maestría en agricultura tropical sostenible, Universidad de Guayaquil-ESPOL.

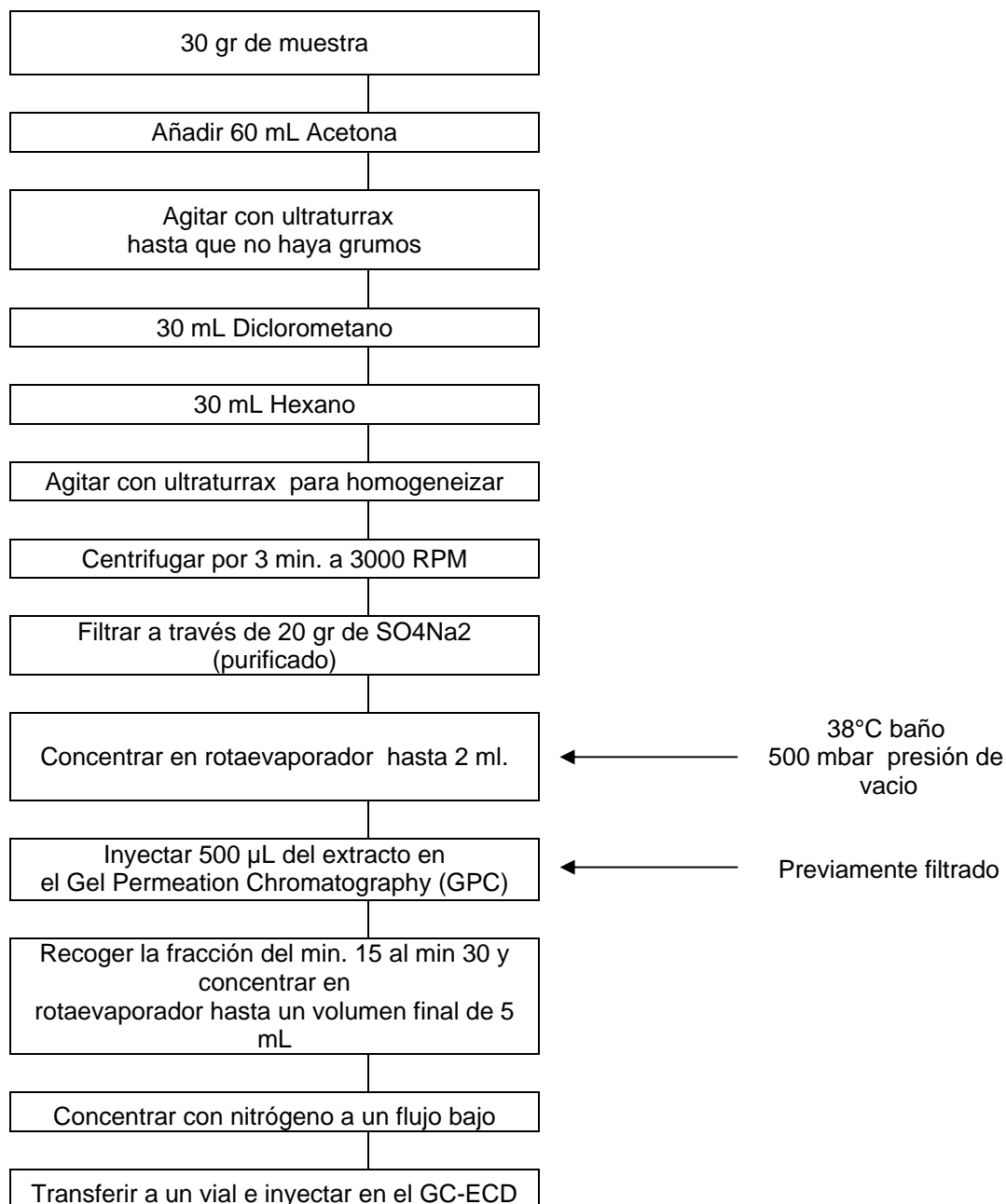
ANEXO 1

DIAGRAMA DE METODO BRASIL



ANEXO 2

MÉTODO CEEA



ANEXO 3

PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PARA MIX HPLC NIVELES DE LA CURVA

Compuesto	Solución Madre ng/μL	
Carbendazim	400	
Thiabendazole	236	
Bitertanol	408	
Compuesto	μL disolución en 10 mL	Nivel 1 (ng/μL)
Carbendazim	12,50	0.5
Thiabendazole	21,20	0.5
Bitertanol	12,25	0.5
Compuesto	μL disolución 10 mL	Nivel 2 (ng/μL)
Carbendazim	25,00	1,00
Thiabendazole	42,40	1,00
Bitertanol	24,50	1,00
Compuesto	μL disolución 10 mL	Nivel 3 (ng/μL)
Carbendazim	50	2,00
Thiabendazole	84,7	2,00
Bitertanol	49	2,00
Compuesto	μL disolución 10 mL	Nivel 4 (ng/μL)
Carbendazim	100	4,0
Thiabendazole	169,5	4,0
Bitertanol	93	4,0
Compuesto	μL disolución 10 mL	Nivel 5 (ng/μL)
Carbendazim	200	8,0
Thiabendazole	338,9	8,0
Bitertanol	196	8,0
Compuesto	μL disolución 10 mL	Nivel 6 (ng/μL)
Carbendazim	250	10,0
Thiabendazole	243,7	10,0
Bitertanol	245	10,0

ANEXO 4

PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PARA MIX GC NIVELES DE LA CURVA

Compuesto	Solución Madre ng/μL	μL S.M en 5 mL	Concentración disolución (ng/μL)
Trifloxystrobina	536	230	24,66
Propiconazol	532	230	24,47
Difenoconazol	476	230	21,90
Azoxystrobina	408	300	24,48
Compuesto	Concentración disolución (ng/μL)	μL disolución en 5 mL	Nivel 1 (ng/μL)
Trifloxystrobina	24,66	100,00	0,05
Propiconazol	24,47	25,00	0,12
Difenoconazol	21,90	120,00	0,53
Azoxystrobina	24,48	50,00	0,24
Compuesto	Concentración disolución (ng/μL)	μL disolución 5 mL	Nivel 2 (ng/μL)
Trifloxystrobina	24,656	25,00	0,12
Propiconazol	24,472	80,00	0,39
Difenoconazol	21,896	230,00	1,01
Azoxystrobina	24,48	100,00	0,49
Compuesto	Concentración disolución (ng/μL)	μL disolución 5 mL	Nivel 3 (ng/μL)
Trifloxystrobina	24,656	100	0,49
Propiconazol	24,472	165	0,81
Difenoconazol	21,896	460	2,01
Azoxystrobina	24,48	210	1,03
Compuesto	Concentración disolución (ng/μL)	μL disolución 5 mL	Nivel 4 (ng/μL)
Trifloxystrobina	24,656	200	1,0
Propiconazol	24,472	200	1,0
Difenoconazol	476	30	2,9
Azoxystrobina	24,48	300	1,0
Compuesto	Concentración disolución (ng/μL)	μL disolución 5 mL	Nivel 5 (ng/μL)
Trifloxystrobina	24,656	300	1,5
Propiconazol	24,472	300	1,5
Difenoconazol	476	40	3,8
Azoxystrobina	24,48	400	2,0
Compuesto	Concentración disolución (ng/μL)	μL disolución 5 mL	Nivel 6 (ng/μL)
Trifloxystrobina	24,656	400	2,0
Propiconazol	24,472	400	2,0
Difenoconazol	476	60	5,7
Azoxystrobina	408	30	2,4

ANEXO 5

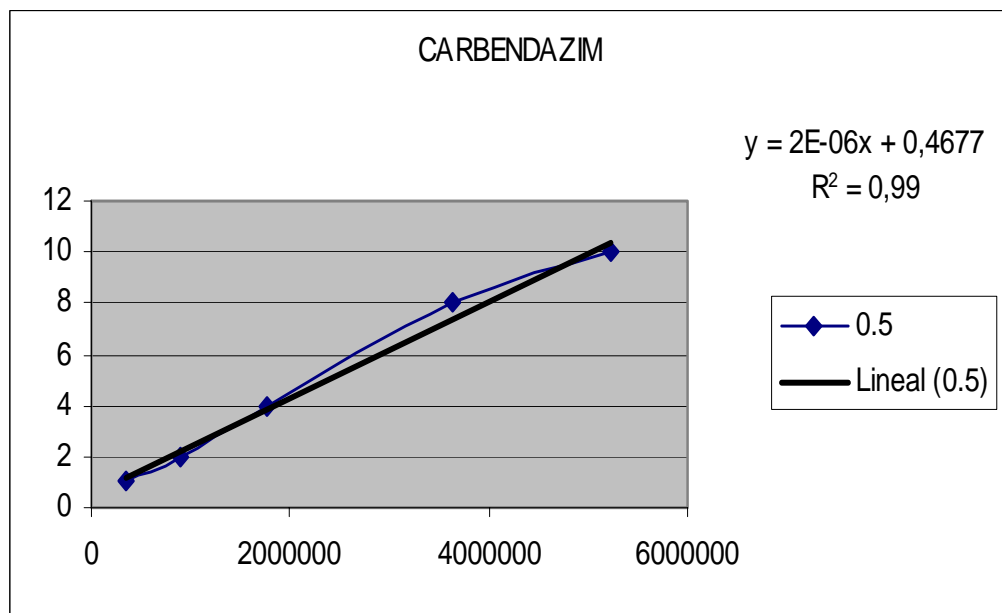
PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PARA IMAZALIL NIVELES DE LA CURVA

Compuesto	Solución Madre ng/μL	
Imazalil	448	
Compuesto	μL disolución en 10 mL	Nivel 1 (ng/μL)
Imazalil	446,00	20,00
Compuesto	μL disolución 10 mL	Nivel 2 (ng/μL)
Imazalil	357,00	16,00
Compuesto	μL disolución 10 mL	Nivel 3 (ng/μL)
Imazalil	268	12,00
Compuesto	μL disolución 10 mL	Nivel 4 (ng/μL)
Imazalil	179	8,0
Compuesto	μL disolución 10 mL	Nivel 5 (ng/μL)
Imazalil	89	4,0
Compuesto	μL disolución 10 mL	Nivel 5 (ng/μL)
Imazalil	22,3	2,0

ANEXO 6

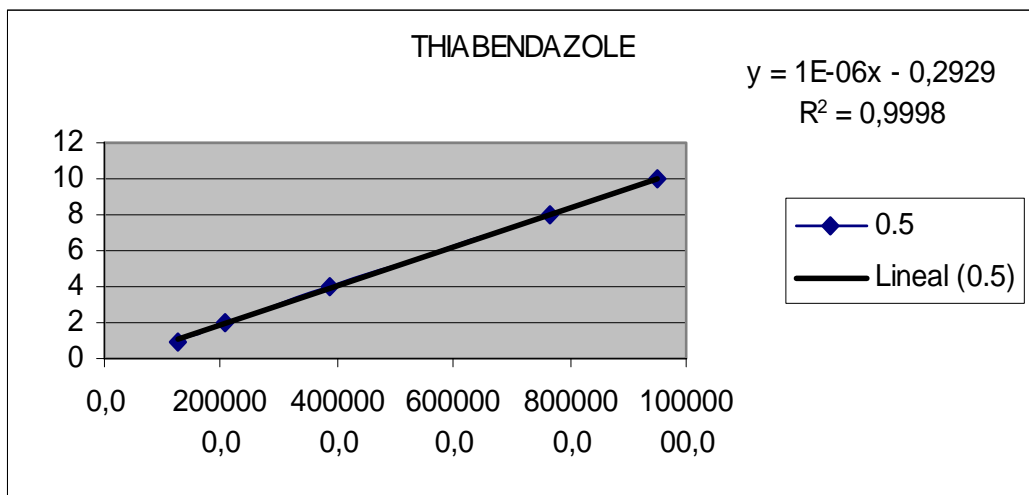
CURVA DE CALIBRACION

CARBENDAZIM



ANEXO 7

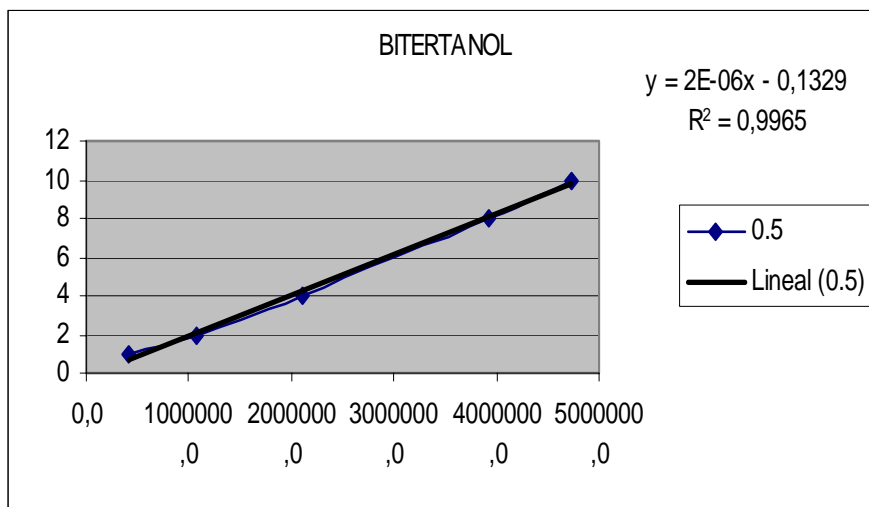
CURVA DE CALIBRACION THIABENDAZOLE



ANEXO 8

CURVA DE CALIBRACION

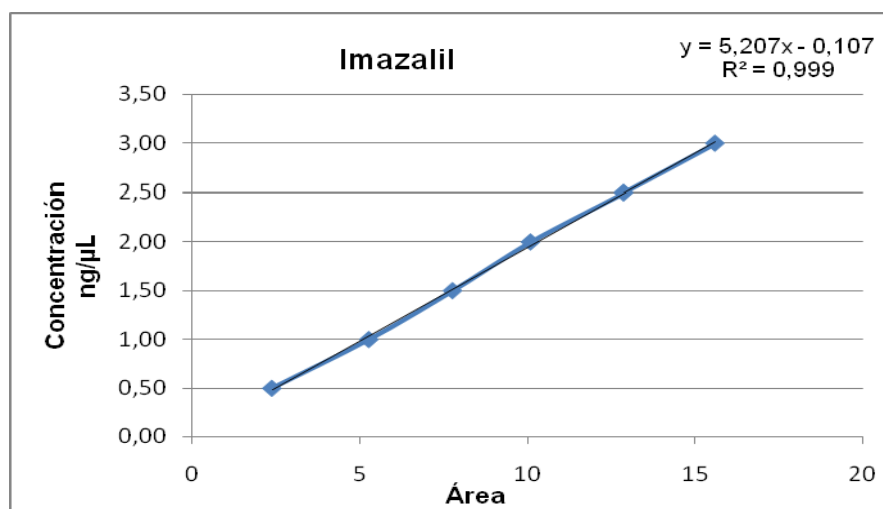
BITERTANOL



ANEXO 9

CURVA DE CALIBRACION

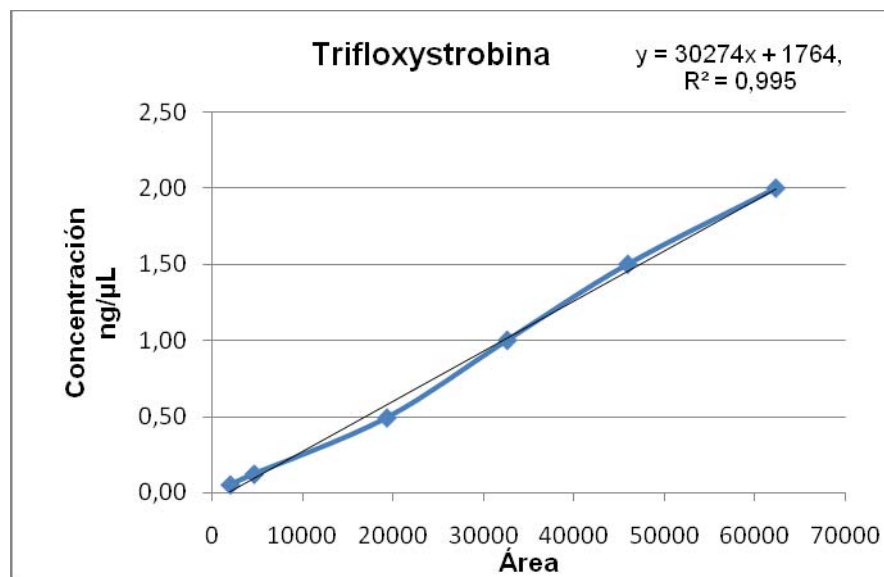
IMAZALIL



ANEXO 10

CURVA DE CALIBRACION

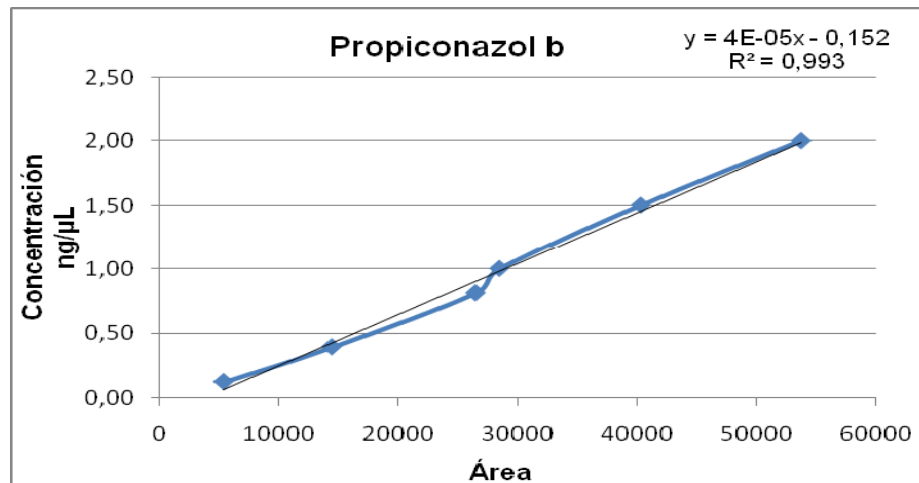
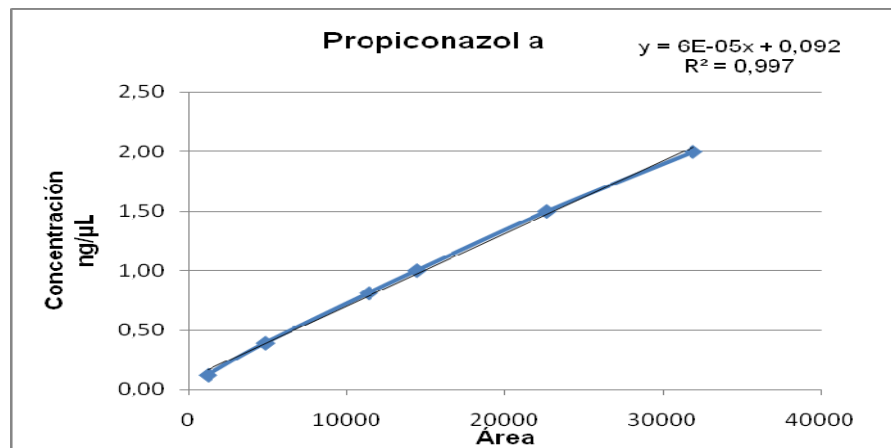
TRIFLOXYSTROBIN



ANEXO 11

CURVA DE CALIBRACION

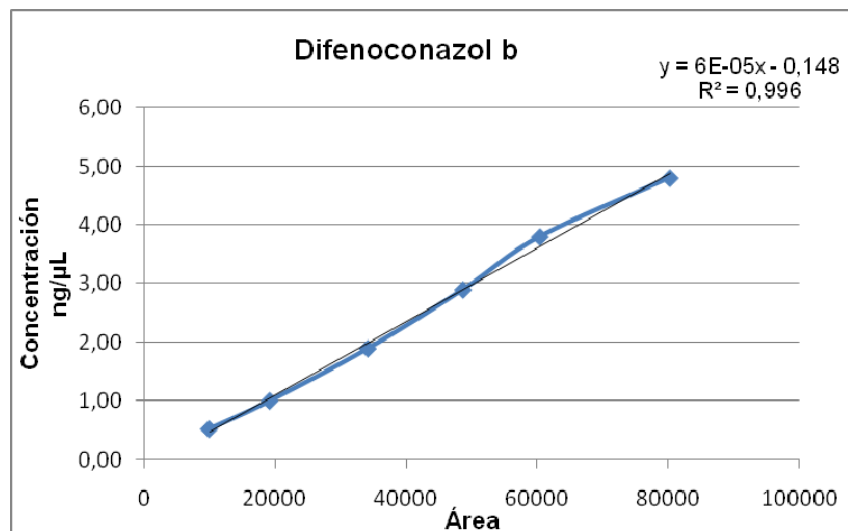
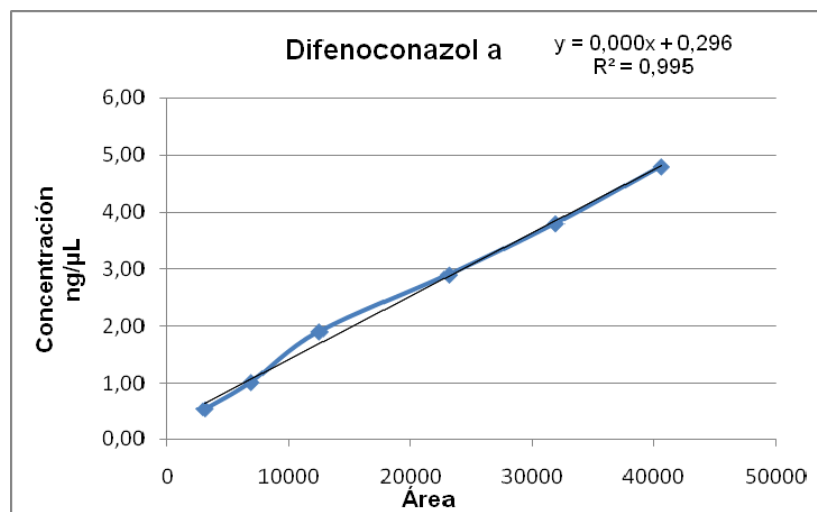
PROPICONAZOL A Y B



ANEXO 12

CURVA DE CALIBRACION

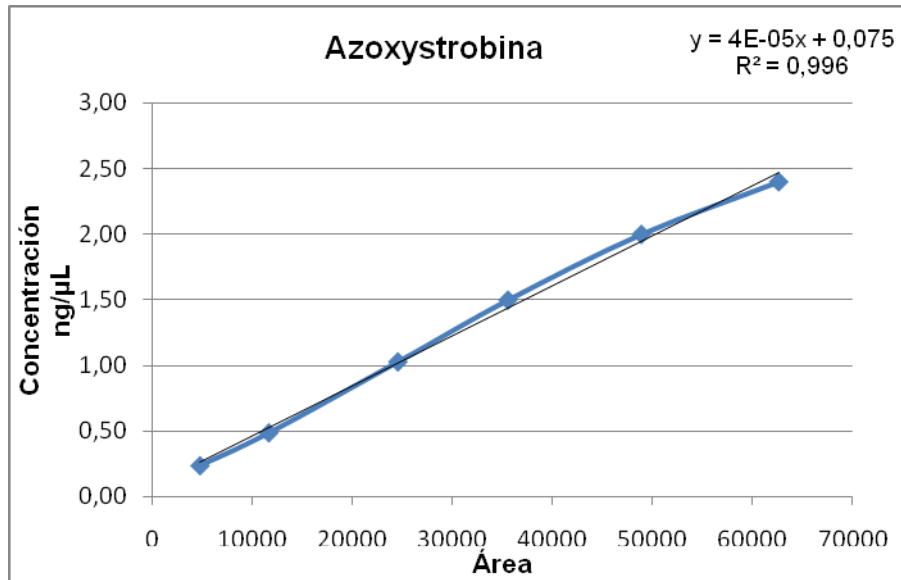
DIFENOCONAZOLE A Y B



ANEXO 13

CURVA DE CALIBRACION

AZOXYSTROBIN



ANEXO 14

EJEMPLO DE FORTIFICACIONES PARA GC

Imazalil

Nivel bajo

7,5 ng
X 1 μ L
 1000 μ L

7500 ng
X 500 μ L
 2000 μ L

30000 ng 2 mL 30 g muestra

Std. 448 ng 1 μ L

30000 ng x = 67 μ L/ std. Imazalil de 448 ng/ μ L

Trifloxystrobina

Nivel medio

0,38 ng
X 1 μ L
 1000 μ L

380 ng
X 500 μ L
 2000 μ L

1520 ng 2 mL 30 g muestra

Std. 24,66 ng 1 μ L

30000 ng x = 62 μ L/ std. Imazalil de 24,66 ng/ μ L

