

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

“Desarrollo de la metodología para la obtención de un candidato a material de referencia de plaguicidas en aguacate”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AMBIENTAL

PRESENTA

GUADALUPE JUDITH SÁINZ URIBE

DIRIGIDA POR

DR. JOSÉ ANTONIO CERVANTES CHÁVEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, 2015.



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

“DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE UN CANDIDATO  
A MATERIAL DE REFERENCIA DE PLAGUICIDAS EN AGUACATE”

Opción de titulación

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental

**Presenta:**

Guadalupe Judith Sáinz Uribe

**Dirigida por:**

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

SINODALES


Dr. José Antonio Cervantes Chávez  
Presidente

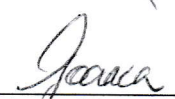
Dra. Mariana Arce Osuna  
Secretario

M. en C. Beatriz Del Rocío Verduzco Cuéllar  
Vocal

M. en C. Gustavo Pedraza Aboytes  
Suplente

Dr. Miguel Ángel Ramos López  
Suplente

  
M.S.P. Sergio Pacheco Hernández  
Director de la Facultad

  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Noviembre 2015.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios por permitirme lograr lo que he anhelado; a mis papás *qepd* por su ayuda, mi madre me enseñó a ser persistente y mi padre me dio muchos ánimos y a lograr lo que me propongo; a mi esposo René por su paciencia y ayuda; a mis 10 hermanos (as), al CENAM por apoyarme para realizar esta maestría, sobre todo al Dr. Yoshito Mitani Nakanishi por la confianza e interés brindados. Al director de la Facultad de Química Sergio Pacheco Hernández, a mis profesores de la maestría: Al Dr. José Antonio Cervantes Chávez, a la M. en C. Beatriz del Rocío Verduzco Cuéllar, al M. en C. Gustavo Pedraza Aboytes, al Dr. Miguel Ángel Rico Rodríguez, al Dr. Miguel Ángel Ramos López, Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar, al Dr. Irineo Torres Pacheco, a la Dra. Maricela González Leal por las enseñanzas; a mis compañeros de la maestría Paco, Ismael, Ricardo y Carlos Eduardo por su apoyo y amistad; a mis compañeros del CENAM Mariana Arce Osuna, Rocío Arvizu Torres, Marco Antonio Ávila Calderón, Víctor Hugo Hernández Maldonado, Diana Gabriela Ramírez Flores, Carina Delia Villanueva Rodríguez, Liliana Lisbet García Soria por la ayuda que me dieron. A Malú Mateos Trigo por su entusiasmo e inspiración.

## RESUMEN

En este trabajo se desarrolló la metodología para la preparación de un candidato a material de referencia de plaguicidas en aguacate. Para ello, algunos árboles de aguacate fueron expuestos por aspersión directa al fruto, follaje y tronco, con una mezcla de los siguientes plaguicidas: acefato, metamidofos, paration, lambda-cialotrina, malation, carbendazim, dimetoato y permetrina (cis y trans). Posteriormente las muestras (expuesta a plaguicidas) y el blanco negativo (aguacate libre de plaguicidas) fueron trituradas, congeladas y se determinaron las condiciones más adecuadas para su secado por liofilización.

Con la pulverización y el tamizado se obtuvo una distribución de tamaño de partícula menor a 300  $\mu\text{m}$ . Una vez homogeneizadas las muestras, éstas fueron envasadas en frascos color ámbar con su correspondiente identificación y se empacaron al vacío para su conservación. Mediante un muestreo aleatorio estratificado se realizaron los análisis de humedad, de distribución de tamaño de partícula y de la fracción de masa de los plaguicidas  $\lambda$  cialotrina, permetrina cis y trans.

El desarrollo de la metodología de extracción de estos últimos plaguicidas se llevó a cabo usando las técnicas de extracción de fase sólida de QuEChERS modificado usando los disolventes: acetonitrilo, acetona, acetona y para la metodología de medición de los plaguicidas se utilizó el método de calibración de estándar interno por la técnica de cromatografía de gases/espectrometría de masas. La fracción de masa promedio de lambda cialotrina del material de plaguicidas fue de 64.74 ng/g con un coeficiente de variación del 11.74 %, para la permetrina cis fue de 225.96 ng/g, y un coeficiente de variación de 8.13 % y para la permetrina trans fue de 451.82 ng/g, y un coeficiente de variación de 11.75 %. Se obtuvo un análisis de varianza de un factor calculando la  $F_{\text{cal}} < F_{\text{crítica}}$ ; de esta forma, se concluye que el material de referencia de aguacate así obtenido, es homogéneo y contiene los plaguicidas de interés en las proporciones esperadas.

**Palabras clave:** Material de referencia, plaguicidas, aguacate, extracción, cromatografía de gases/espectrometría de masas.

## SUMMARY

This document summarizes the methodology for preparation of a candidate reference material developed for pesticides in freeze dried avocado. To do this, the fruit, leaves and trunk of some avocado trees were exposed by direct spray to a mixture of the pesticides: acephate, methamidophos, parathion, lambda-cyhalothrin, malathion, carbendazim, dimethoate and permethrin.

Later the samples exposed to pesticides and a negative blank (avocado free of pesticides) were crushed, frozen, and the most appropriate conditions for freeze-drying were determined.

With the pulverization and sieving processes a size distribution of particle less than 300 microns was obtained. Once the samples were homogenized, they were packaged in amber vials with the corresponding identification and vacuum packed for preservation.

By stratified random sampling, the analysis of mass fraction of  $\lambda$  cyhalothrin, permethrin cis and trans were performed. Else, the determination of moisture and particle size distribution was done. The development of the methodology for extracting the last pesticides was carried out using solid phase extraction modified QuEChERS using the following solvents: acetonitrile, acetone, acetone and the measurement methodology of pesticides by internal standard calibration with gas chromatography/mass spectrometry triple quadrupole techniques.

The average of mass fraction of lambda cyhalothrin in the material of pesticides was of 62.3 ng/g with a relative standard deviation of 13 %, for permethrin cis the average content was of 217 ng/g with a relative standard deviation of 11 % and lastly the average content of permethrin trans was of 424 ng/g with a relative standard deviation of 17 %.

An analysis of one variance factor was obtained by calculate the  $F_{cal} < F_{critical}$ ; thus, it is concluded that the avocado reference material is homogeneous and contains the pesticides of interest in the expected proportions.

**Key words:** Reference material, pesticides, avocado, extraction, gas chromatography/mass spectrometry.

## Contenido

<b>I. INTRODUCCION</b> .....	1
<b>II. MOTIVACIÓN DE LA PROPUESTA</b> .....	3
<b>III. FUNDAMENTACION TEÓRICA</b> .....	4
3.1 El aguacate .....	4
3.2 Plagas del aguacate .....	7
3.3 Plaguicidas.....	8
3.4 Normatividad sobre el uso de plaguicidas en el aguacate .....	12
3.5 Métodos para determinar humedad .....	14
3.6 Contenido de humedad de los alimentos .....	19
3.7 Actividad acuosa.....	19
3.8 Materiales de referencia certificados (MRC).....	20
3.9 Métodos de análisis cromatográficos.....	24
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	30
<b>V. OBJETIVO GENERAL</b> .....	30
<b>VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	30
<b>VII. METODOLOGIA</b> .....	30
7.1 Exposición de plantas de aguacate a plaguicidas.....	30
7.2 Selección de los frutos expuestos para la determinación del nivel de exposición a plaguicidas, de acuerdo a los criterios de maduración. ....	33
7.3 Obtención de un lote homogéneo de las muestras de aguacate liofilizado.....	35
7.4 Desarrollo de una metodología de medición.....	41
7.5 Desarrollo de la metodología para medir la fracción de masa de los plaguicidas en el candidato a material de referencia .....	45
7.6 Obtención de un candidato a material de referencia.....	48
<b>VIII. RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	49
8.1 Exposición de plantas de aguacate a plaguicidas.....	49
8.2 Selección de los frutos expuestos para la determinación del nivel de exposición a plaguicidas, de acuerdo a los criterios de maduración. ....	51
8.3 Obtención de un lote homogéneo de las muestras de aguacate liofilizado.....	52
8.4 Desarrollo de una metodología para la extracción de los plaguicidas en aguacate. ....	62
8.5 Desarrollo de la metodología para medir la fracción de masa de los plaguicidas en el candidato a material de referencia .....	66

8.6. DISCUSION .....	77
<b>IX. CONCLUSIONES .....</b>	<b>78</b>
<b>X. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>79</b>
<b>XI.REFERENCIAS .....</b>	<b>80</b>

## INDICE DE CUADROS

1.- Principales exportaciones mexicanas de frutos. ....	6
2.- Solubilidad en agua de los plaguicidas de interés. ....	9
3.- Clasificación de los plaguicidas adicionados a los árboles de aguacate.....	11
4.- Límites máximos de residuos de plaguicidas de interés en los países de mayor importación de aguacate mexicano.....	13
5.- Clasificación de los métodos para la determinación de humedad. ....	15
6.- Propiedades de disolventes comunes utilizados en el análisis de residuos de plaguicidas. ....	29
7.- Cantidades sugeridas a adicionar de los plaguicidas en el árbol de aguacate. ....	31
8.- Tipo de plaguicidas individuales, identificación y código.....	32
9.- Identificación de la mezcla y secuencia de la aplicación de cada plaguicida.....	32
10.- Equipos utilizados en la preparación de los materiales de referencia de aguacate liofilizado. ....	33
11.- Características de los plaguicidas utilizados para preparar las disoluciones para la dosificación. ....	50
12.- Relación de árboles expuestos a plaguicidas semanalmente para tener una mezcla.....	51
13.- Condiciones del programa de liofilización.....	53
14.- Datos del % de humedad en función del tiempo de los MR DMR-516a y DMR-523a. ....	60
15.- Distribución del tamaño de partícula del DRM-516a Plaguicidas en aguacate liofilizado. ....	61
16.- Distribución del tamaño de partícula del DRM-523a Aguacate libre de plaguicidas. ....	62
17.-. Disolventes usados en el proceso de extracción para validar la recuperación. ....	63
18.-. % de recuperación de las extracciones en el blanco fortificado.....	64
19.-. % de recuperación de las extracciones en el material de referencia de plaguicidas. ....	65
20.-. Pares de iones de los plaguicidas objetivo. ....	66
21.- Fracción de masa de lambda cialotrina en las muestras (ng/g). ....	70
22.- Fracción de masa de permetrina cis en las muestras (ng/g).....	70
23.- Fracción de masa de permetrina trans en las muestras (ng/g).....	70
24.- Plaguicidas adicionados a los árboles de aguacate y su clasificación.....	85
25.- Relación de árboles expuestos a plaguicidas de manera individual. ....	89
26.-. Obtención del % de humedad y correcciones por empuje del aire de la charola vacía (blanco).....	90

## INDICE DE FIGURAS

1.- Aguacate <i>Persea americana</i> .....	4
2.- Rancho las Pilas, Zitácuaro, Mich., México.....	31
3.- Árboles identificados.....	34
4.- Selección de aguacates de la huerta.....	34
5.-Proceso de subdivisión.....	37
6.- Muestras en el desecador.....	39
7.- Picnómetros utilizados para medir densidad de sólidos o polvos.....	40
8.- Selección de aguacates, corte y triturado de éstos.....	52
9.- Eficiencia del proceso de liofilización en porciento de materia seca.....	54
10.- Proceso de liofilización.....	54
11.- Eficiencia del proceso de la molienda en porciento de materia seca.....	55
12.- Molienda del aguacate.....	55
13.- Eficiencia del proceso de tamizado en porciento de materia seca.....	56
14.- Eficiencia del proceso de tamizado de los dos MR, blanco y matriz, en cada malla. .....	56
15.- Mallas de diferentes tamaños para el tamizado.....	57
16.- Subdivisión u homogenización del aguacate.....	57
17.- Eficiencia total del proceso de preparación de los materiales de referencia.....	58
18.- Envasado, sellado y etiquetado del producto.....	58
19.- Empacado al vacío.....	59
20.- % de humedad en función del tiempo en los materiales de referencia DMR-516a y DMR-523a.....	59
21.- Distribución del tamaño de partícula del DRM-516a Plaguicidas en aguacate liofilizado.....	60
22.- Distribución del tamaño de partícula del DRM-523a Aguacate libre de plaguicidas. .....	61
23.- Gráfico de la curva de calibración de lambda cialotrina.....	68
24.- Gráfico de la curva de calibración de la permetrina cis.....	69
25.- Gráfico de la curva de calibración de permetrina trans.....	69
26.- Cromatograma del MR de plaguicidas en la matriz de aguacate.....	73
27.- Cromatograma de la lambda cialotrina.....	74
28.- Cromatograma de la permetrina cis.....	75
29.- Cromatograma de la permetrina trans.....	76
30.- Coordenadas de localización del rancho las pilas.....	88



## I. INTRODUCCION

El aguacate es uno de los principales frutos que se consumen en el país y ocupa el segundo lugar de exportación, después del jitomate; México es el país líder en la exportación a nivel mundial representando el 39 % del comercio internacional, destacando Estados Unidos, Japón y Canadá.

Entre julio de 2014 y enero de 2015 se registró un incremento del 39 % en las exportaciones de este fruto a Estados Unidos, con respecto al mismo periodo de 2013-2014, siendo en total 365 mil 639 toneladas.

En el periodo 2014-2015 se han exportado, además 22 mil 428 toneladas de aguacate a Japón; 17 mil 331 a Canadá; 12 mil 671 a Centroamérica; seis mil 676 a Europa y tres mil 490 a los países de Asia, es decir, un total de 62 mil 596 toneladas. Las ganancias económicas acumuladas del país de 1999 a diciembre del 2014 por la comercialización de este producto a Estados Unidos representaron un total de \$ 1317.4 millones de dólares, a Japón un total de \$ 141.6 millones de dólares y a Canadá de \$ 35.2 millones de dólares (SIAP, 2014) beneficiando a los estados y/o regiones productoras de Michoacán, Jalisco y Morelos, los cuales aportan el 90 % de la producción nacional.

El comercio del aguacate hacia Japón es importante ya que en los últimos 8 años ha aumentado cuatro veces en valor, debido a que lo demandan con buena calidad, incrementado así su costo; sin embargo, sus requerimientos son estrictos, puesto que el aguacate no debe contener plaguicidas o bien, que los contenga en un límite especificado por su regulación, además de cumplir con los análisis organolépticos y valores nutrimentales determinados (SIAP, 2014). Los plaguicidas son compuestos químicos que pueden causar efectos adversos en los individuos, en el caso de alimentos, debido a la ingestión de productos contaminados. El uso de plaguicidas en productos vegetales con naturaleza grasa implica un riesgo adicional para la salud humana, debido a la solubilidad de los plaguicidas no polares en la grasa del cuerpo y al consecuente efecto de concentración que sucede en el vegetal.

La presencia de estos residuos ilegales y/o fuera del nivel de tolerancia, constituye una barrera no arancelaria para el comercio internacional del aguacate, esto se debe al uso en el campo de productos no autorizadas o no recomendadas, además de que no se respeta la dosis de aplicación o los intervalos de seguridad recomendados, así como a

la restricción de los mismos en los mercados nacionales e internacionales. Por tal motivo es importante analizar y monitorear los plaguicidas en los frutos para investigar la relación entre la exposición y los riesgos a la salud; razón por la cual es necesario realizar estudios analíticos que sean exactos y confiables.

Los laboratorios que brindan este servicio al sector, generalmente cuentan con estándares de plaguicidas puros, pero no tienen un material de referencia certificado, en matriz de aguacate, con y sin plaguicidas, que sirvan para introducirlos en el mismo proceso de medición que las muestras y reproducir los resultados; con lo que aseguren que las mediciones son confiables en cualquier laboratorio a nivel mundial y que los resultados que se emiten son correctos; garantizando así la exportación y recepción del producto de acuerdo a las normas del país importador.

Un material de referencia certificado (MRC) es un material de referencia acompañado de un certificado, para el cual el valor de una (o de varias) de sus propiedades se ha certificado por medio de un procedimiento que establece su trazabilidad a una realización exacta de la unidad en que se expresan los valores de la propiedad y en el que cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con un nivel de confianza declarado (NMX-CH-160-IMNC-2006, 2006).

Para el desarrollo de este proyecto fue importante contar con un producto que contenga los plaguicidas integrados en el fruto y que sean aquellos que comúnmente usan los agricultores para erradicar las plagas que infestan sus cosechas; una vez que se exponen a los árboles de aguacate con plaguicidas, los frutos cosechados de estos árboles, se podrán utilizar para preparar un material de referencia usando el método de secado por liofilización para su conservación, proceso de deshidratación que hace al material que se conserve estable.

La implementación de la metodología para medir plaguicidas en este tipo de matriz representa un desafío analítico, ya que el aguacate contiene gran cantidad de grasa (entre el 17 % y 20 %), además de que la fracción de masa de los plaguicidas es a niveles traza, lo cual implica innovar una metodología que permita identificar el analito en cuestión.

El método de extracción implementado por (Annastasiades, 2003) es conocido como QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) para optimizar

procedimientos de extracción y limpieza, con un énfasis en la minimización de costos, tamaño de la muestra y el tiempo de preparación. Los métodos de medición utilizados son la cromatografía de gases (CG) la cual ha sido históricamente empleada, predominante en el análisis múltiple de residuos de plaguicidas y durante las dos últimas décadas los instrumentos de cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS), un solo cuadrupolo y más recientemente GC/MS/MS triple cuadrupolo y la cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (LC/MS/MS).

## **II. MOTIVACIÓN DE LA PROPUESTA**

Debido a la gran cantidad de plagas que se presentan en los árboles de aguacate, al uso indiscriminado de plaguicidas por los agricultores, así como a las afectaciones al medio ambiente, accidentes y al uso persistente de plaguicidas que han ocasionado la contaminación de productos, ya sean frescos o procesados, ocasionando enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) causadas por la presencia de microorganismos patógenos, metales pesados y sustancias orgánicas (plaguicidas, entre otros), han puesto en riesgo la calidad de los productos, así como la inocuidad y seguridad alimentaria, representando un reto importante para los productores mexicanos en la competencia con otros países, en donde las regulaciones constituyen un papel muy importante en el comercio internacional, la protección a la salud y al medio ambiente (Calderón, 2009). El problema para los productores mexicanos es que no se cuenta con laboratorios confiables que garanticen la calidad de los resultados de las mediciones de estos contaminantes, teniendo que recurrir a laboratorios u organizaciones extranjeras para su realización o bien para obtener patrones de medición o materiales de referencia certificados, incrementando así los costos y tiempos de disposición de los resultados de los análisis requeridos para corroborar la calidad de los aguacates y así poder exportarlos. Otro problema que tenemos en México es la falta de normatividad nacional equiparable con la legislación internacional, lo cual retarda y dificulta las negociaciones de libre comercio. Se considera que es de carácter inminente que México disponga de las herramientas metrológicas necesarias para poder verificar, con sustento científico, los compuestos considerados como contaminantes, evitando en lo posible rechazos de

los productos; por lo que es de suma importancia tener disponibilidad de MRC, en matriz vegetal, que se utilicen para evaluar la competencia técnica de los laboratorios, mediante la participación exitosa en ensayos de aptitud, contar con métodos analíticos validados que sean transmitidos a estos laboratorios para que puedan medir la fracción de masa de los plaguicidas, con alta exactitud.

Es por ello que se desarrollarán y prepararán dos candidatos a MR (uno sin plaguicidas y el otro con plaguicidas), con el propósito de que estas metodologías sirvan en un futuro para certificar a los dos materiales de matriz de aguacate.

El desarrollo de los MR de plaguicidas en el fruto del aguacate serán los primeros que se elaboren a nivel mundial; dichos materiales podrán ser utilizados por otros países productores, avalando de manera exacta y confiable la cantidad presente de plaguicidas en el fruto.

### III. FUNDAMENTACION TEÓRICA

#### 3.1 El aguacate

El nombre del aguacate proviene del náhuatl (*Ahuacatl*), palabra que significa “testículos del árbol”. El aguacate, *Persea americana* o *Persea gratissima*, es un fruto de origen mexicano rico en carbohidratos, grasa y fibra. Por su aportación nutricional y sus diferentes usos en las industrias: alimenticia, cosmética y farmacéutica, el aguacate representa un alto valor comercial.



**Figura 1.-** Aguacate *Persea americana*.

En cuanto a las características botánicas, el aguacate se clasifica de la siguiente manera:

Clase: Dicotiledoneae.

Sub clase: Dialipétala.

Orden: Ranales.

Familia: Lauraceae.

Género: *Persea*.

Especie: americana.

(Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), 2008).

Hay docenas de variedades de aguacate que se dividen en tres categorías principales: Los aguacates de México, aguacates de Guatemala y los aguacates de las Indias Occidentales que difieren en su tamaño, apariencia, sabor, calidad nutrimental y sensibilidad al frío. El tipo de aguacate más popular en los Estados Unidos y en Japón es la variedad denominada aguacate *Hass*. El aguacate *Hass* proviene de injerto, mezcla de diferentes variedades de aguacate, desarrollado por Rudolph Hass.

La característica más distintiva del aguacate *Hass* es que su piel cambia de color verde, a color púrpura oscuro cuando está maduro. Esta variedad es la que se cultiva principalmente en California, USA. La piel de este tipo de aguacate es rugosa pero flexible. El aguacate *Hass* es de forma ovalada y tiene semilla pequeña, se puede pelar fácilmente y tiene un excelente sabor; su peso oscila entre 140 g y 340 g.

Las principales exportaciones mexicanas de los grupos arancelarios de frutos que se han exportado en los últimos cinco años, se observan en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.-** Principales exportaciones mexicanas de frutos.

Producto	Valor exportado (Miles de dólares)	Participación mexicana en las exportaciones mundiales (porcentaje)	Primer exportador	Segundo exportador	Tercer exportador
Aguacate	892 938	45.2	México	Chile	Perú
Nuez de nogal con y sin cáscara	513 218	20.9	Estados Unidos	México	Francia
Sandía	283 715	23.9	México	España	Estados Unidos
Limón	274 356	13.4	España	México	Turquía
Guayaba y mango	255 107	16.2	México	India	Brasil
Fresa	210 986	9.0	España	Estados Unidos	México
Papaya	63 717	30.1	México	Brasil	Estados Unidos

(Campo mexicano, 2015)

### 3.2 Plagas del aguacate

Al igual que todos los cultivos, las plantas de aguacate pueden ser susceptibles a una gran diversidad de plagas y enfermedades que podrían amenazar la calidad de los frutos o incluso poner en peligro la vida de toda la planta. Saber cómo reconocerlos y solucionar estos problemas será crucial para mantener un árbol de aguacate productivo y sano. Las plagas que más comúnmente se encuentran en el aguacate son las siguientes:

**Gusano barrenador de hueso (*Heilipus lauris Boheman*):** La hembra deposita sus huevecillos bajo la epidermis del fruto en desarrollo, la larva se introduce en la pulpa hasta llegar al hueso. El daño principal lo ocasiona al alimentarse del hueso, provocando la caída prematura del fruto, lo que puede provocar la pérdida total en la producción.

**Trip del aguacate (*Heliothrips haemorrhoidalis*):** Ocasiona daños en frutos y flores, produciendo malformaciones; inhibe la fecundación de flores al lesionar los órganos sexuales; origina la caída de las mismas y deteriora mucho a los frutos recién formados por la aparición de alteraciones irregulares en la cáscara.

**Araña de cristal (*Oligonychus*):** Esta plaga se presenta en época seca, los adultos succionan los jugos de las hojas, produciendo manchas amarillentas en las mismas. En casos severos, los árboles se debilitan y tiran sus hojas.

**Taladrador del tronco (*Copturomimus perseae gunther*):** Esta plaga come la madera de troncos, ramas y nuevos brotes, ocasionando regularmente que las ramas se trocen por el peso de la fruta. Las zonas dañadas son fáciles de detectar por la presencia de aserrín en polvo.

**Acaro de las agallas (*Eriophyes*):** Su ataque provoca la paralización del desarrollo del fruto, produce daños severos formando protuberancias en las hojas.

**Perforador del fruto (*Stenomema catenifer*):** Los huevecillos son depositados sobre los frutos o las ramas tiernas, en su etapa de desarrollo penetra la cáscara y la fruta. Los desechos dejados por las larvas dentro del fruto provocan su pudrición.

**Gusano arrollador de la hoja (Platynota):** Es una larva color verde claro, que al raspar la epidermis de las hojas las adhiere provocando su desecación (SAGARPA, 2011).

### 3.3 Plaguicidas

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO (Food and Agriculture Organization por sus siglas en Inglés), es el principal organismo encargado de dirigir las actividades internacionales de lucha contra el hambre (FAO, 2015). Un plaguicida es definido por la FAO como "cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o de otra manera interfieren con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a animales para el control de insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos". El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes o agentes para el raleo de fruta o para evitar la caída prematura de la fruta y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha, para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y su transporte (Mastovska, 2013).

Los plaguicidas son necesarios y esenciales en la producción agrícola, debido a que son extensamente usados para proteger a las plantas contra plagas y enfermedades, con la intención de mejorar la producción. Su uso representa un reto, ya que, existe el riesgo de la presencia de los residuos de estos químicos que permanecen en el fruto y que podrían ser consumidos por los humanos. Por esta razón, los gobiernos y las organizaciones internacionales han publicado una lista de plaguicidas y sus tolerancias o límites de residuos máximos permitidos (Cuadro 4) (Columé, 2001). El número de plaguicidas utilizados está aumentando continuamente a medida que las sustancias activas nuevas se están desarrollando y registrando. La edición actual del manual de plaguicidas, es una fuente completa de información sobre los plaguicidas, que incluye más de 1 600 compuestos.



Para fines regulatorios, las definiciones de residuos de plaguicidas incluyen el compuesto original y cualquier derivado especificado como producto de degradación y conversión de los metabolitos y las impurezas toxicológicas que se consideren de importancia.

### 3.3.1 Descripción de los plaguicidas utilizados en este trabajo:

Los plaguicidas adicionados a los árboles de aguacate en este trabajo fueron: Metil paration, dimetoato, malation, metamidofos, acefato, carbendazim, permetrina y lambda cialotrina.

Su solubilidad en agua se indica en el cuadro 2.

**Cuadro 2.-** Solubilidad en agua de los plaguicidas de interés.

Plaguicidas	Solubilidad en agua	Polaridad	Masa molar g/mol	Nombre IUPAC
Acefato	Alta, 818 g/L a 25 °C	Muy polar	183.2	acetiltiofosforamidato de O,S-dimetilo
Metamidofos	Muy soluble, > 200 g/L a 20 °C	Muy polar	141.1	O,S-dimetil fosforamidotiodato
Dimetoato	23.8 g/L a 20 °C	Polar	229.28	O,O-Dimetil-Smetil-carbamoil metilfosforoditioato
Malatión	145 mg/L a 20 °C	Polaridad intermedia	330.358	2-[(dimetoxifosforotioil)sulfanil]butanodioato de dietilo
Metil paratión	55 mg/L a 20 °C	Polaridad intermedia	291.3	O, O-Dietil-O-4-nitro-feniltiofosfato
Carbendazim	8 mg/L a 24 °C	Polaridad intermedia	191.187	Methyl 1H-benzimidazol-2-ylcarbamate
Permetrina	Baja, 6.00 x 10 <sup>-3</sup> mg/mL a 20 °C	Polaridad baja	391.28	3-Phenoxybenzyl (1RS)-cis,trans-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate
Lambda cialotrina	Poco, 5.00 x 10 <sup>-3</sup> mg/L a 20 °C	Polaridad baja	449.9	3-(2-cloro-3,3,3-trifluoro-1-propenil)-2,2-dimetil-ciano(3-fenoxifenil)metil ciclopropanecarboxilato

(COFEPRIS, 2015)

Los plaguicidas organofosforados (OPPS) son sustancias biodegradables en la naturaleza, sin tendencia a acumularse en las grasas del organismo, pero con gran actividad neurotóxica (por ejemplo, diclorvos, metil paratión, clorpirifos, diazinon, demeton- S-metilo, fosalona, fonofos, metamidofos, monocrotofos, clorfenvinfós, fenitrotión, malatión) son los principales grupos de compuestos que se utilizan para proteger a las plantas.

Incluyen todos los compuestos orgánicos que contienen fósforo y se utilizan para combatir las plagas en plantaciones industriales, huertos y cultivos de hortalizas.

Su toxicidad consiste en inhibir la actividad de las enzimas que controlan las funciones del sistema nervioso, principalmente la acetilcolinesterasa y actúa a través del contacto o sistémicamente (Fenik, 2011).

Los plaguicidas piretroides son menos perjudiciales para los mamíferos, solo el padre piretroide muestra toxicidad por presencia de metabolitos tóxicos, sin embargo, aún no se ha demostrado (Columé, 2001). La lambda cialotrina y la permetrina pertenecen a este grupo.

La lambda cialotrina, 3-(2-cloro-3,3,3-trifluoro-1-propenil)-2,2-dimetil-ciano (3-fenoxifenil) metil ciclopropanecarboxilato es un insecticida, con acción sobre el sistema nervioso del insecto, es efectivo para el control de insectos masticadores, picadores y chupadores en cultivos extensivos e intensivos; posee acción por contacto, ingestión y repelencia de larvas y adultos. Afecta el sistema nervioso central mediante la intervención en los canales de sodio, causando hiper excitación y bloqueo nervioso, seguido por la muerte del insecto.

La permetrina, el 3-fenoxibencil-3-(2,2-diclorovinil) 2-2,2 dimetil ciclo propano carboxilato es un fármaco escabicida ampliamente utilizado en el tratamiento de las denominadas enfermedades sociales y además su uso también se ha extendido para la prevención de la malaria en zonas tropicales (P. Modanio Charles, 2001), así como para la plaga de la mosca verde *Aethalio quadratum*.

El carbendazim  $C_9H_9N_3O_2$  está compuesto de metil benzimidazol-2-ilcarbamato, es de la familia de los benzimidazoles. Es un fungicida poco persistente. En el aire está presente en la fase particulada, la cual es eliminada físicamente por gravedad o precipitación húmeda. Es ligeramente tóxico para crustáceos, pero tóxico para aves. Es equivalente

al mecanismo de acción de los organofosforados, uniéndose a las colinesterasas e inactivándolas. Pero esta unión es reversible espontáneamente en menos de una hora, de manera que en el curso de una intoxicación aguda por carbamatos se manifiestan los mismos signos y síntomas de la intoxicación por organofosforados pero con un curso más rápido hacia la recuperación (COFEPRIS, 2015).

**Cuadro 3.-** Clasificación de los plaguicidas adicionados a los árboles de aguacate.

<b>Tipos de Plaguicidas</b>	<b>Plaguicidas</b>	<b>Características</b>
Organofosforados	Metil paratión, dimetoato, malatión,metamidofos, acefato	-Biodegradables -Baja acumulación en tejido graso -Actividad neurotóxica
Carbamatos	Carbendazim	-La intoxicación aguda por carbamatos se manifiesta con los mismos signos y síntomas de la intoxicación por organofosforados pero con una recuperación más rápida.
Piretroides	Permetrina y lambda cialotrina	-Son compuesto más tóxicos para los insectos y también para los peces. -Son relativamente biodegradables y no causan resistencia entre los insectos. Representan lo más antiguo y a la vez, lo más novedoso de los insecticidas.

(COFEPRIS, 2015).

### **3.4 Normatividad sobre el uso de plaguicidas en el aguacate**

En la mayoría de los países existen normativas en las que se registran los límites máximos tolerados de cada uno de los plaguicidas, en Japón está the Japanese positive list system for Agricultural Chemical Residues in Foods, 2006; en USA la autoridad reguladora Environmental Protection Agency's (EPA's) quien estableció las tolerancias en las secciones 408 y 409 del Federal Food, Drug and Cosmetic Act. Éstas son colocadas en el Title 40 del Code of Federal Regulations (CFR), part 180 para materia prima de productos agrícolas, part 185 para alimentos procesados (Food and Drug Administration, 1968). En la Comunidad Económica EU pesticides database, Active Substances, regulation (EC) No. 396/2005 y en Canadá la Health Canada; MRL Database for avocado.

En México, la Dirección General de Investigación sobre la Contaminación Urbana y Regional (DGICURG), que pertenece al Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), difunde información sobre el manejo adecuado de las sustancias químicas, participa en la ejecución de estrategias de monitoreo y evaluación ambiental, desarrolla inventarios sobre plaguicidas y sustancias tóxicas y genera estrategias de investigación sobre comunicación de riesgos. Esta dirección, mediante la Investigación sobre Sustancias Químicas y Riesgos Ecotoxicológicos y el Sistema de Consulta de Plaguicidas, enlista los plaguicidas permitidos, prohibidos y restringidos.

Por otra parte, la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) (COFEPRIS, 2015) apoya sus acciones en la Ley General de Salud y en la Ley Federal de Sanidad Vegetal para el manejo adecuado de plaguicidas y fertilizantes en la agricultura y medidas fitosanitarias. Los únicos plaguicidas cuya importación, comercialización y uso están permitidos en México, son los que han sido registrados por la CICOPLAFEST.

Los límites máximos tolerados de la normativa extranjera se resumen en la siguiente tabla:

**Cuadro 4.-** Límites máximos de residuos de plaguicidas de interés en los países de mayor importación de aguacate mexicano.

<b>Plaguicidas</b>	<b>Japón<sup>1</sup> mg/kg</b>	<b>USA<sup>2</sup> mg/kg</b>	<b>México<sup>3</sup> mg/kg</b>	<b>UE<sup>4</sup> mg/kg</b>	<b>Canadá<sup>5</sup> mg/kg</b>
Acefato	0.01	-----	No autorizado	0.01	-----
Metamidofos	0.01	-----	No autorizado	0.01	-----
Paratión	0.05	-----	-----	0.05	-----
Lambda cialotrina	0.5	0.2	No autorizado	0.02	0.2
Malation	8.0	8.0	8.0	0.02	8.0
Carbendazim	3.0	-----	No autorizado	0.1	-----
Dimetoato	1.0	-----	No autorizado	0.02	-----
Permertrina	5.0	1.0	1.0	0.05	-----

<sup>1</sup>The Japanese positive list system for Agricultural Chemical Residues in Foods, 2006.

<sup>2</sup> USA, autoridad reguladora Environmental Protection Agency's (EPA's) Tolerances and exemptions for pesticide chemical residues in food, 2013.

<sup>3</sup>México: Publicación de lista de plaguicidas aprobados para usarse en los cultivos por la SAGARPA y la Secretaría de Salud.

<sup>4</sup>EU pesticides database, Active Substances, regulation (EC) No. 396/2005. Pesticides Web Version - EU MRLs (File created on 29/01/2014 17:41)

<sup>5</sup>Health Canada; MRL Database for avocado; <http://pr-rp.hc-sc.gc.ca/mrl-lrm/index-eng.php>

Las Normas Oficiales Mexicanas (NOMs) y las Normas Mexicanas (NMXs) que aplican para el producto de aguacate son:

NOM-128-SCFI-1998.- información comercial-etiquetado para productos agrícolas-aguacate que se plasmó en los envases.

NMX-FF-016-SCFI-2006.- productos frescos no industrializados para uso humano, fruta fresca – aguacate.

NOM-066-FITO-2002, que tiene por objetivo el manejo fitosanitario y movilización del fruto y controlar el barrenador de hueso.

### **3.5 Métodos para determinar humedad**

El agua absorbida por los materiales sólidos se clasifica generalmente como agua ligada por fuerzas físicas o agua vinculada por enlaces químicos. Físicamente el agua ligada incluye agua absorbida, atrapada o el agua líquida incluida. El conocimiento de los contenidos de humedad exactos y reproducibles en la determinación cuantitativa de un mensurando es esencial para minimizar posibles errores sistemáticos. Las correcciones de masa seca erróneas influyen directamente en el resultado obtenido y en su presupuesto de incertidumbre. De hecho, son con frecuencia difíciles las determinaciones correctas de agua por técnicas de secado o no pueden ser alcanzadas con resultados confiables.

Para un productor de MR, el contenido de humedad influye directamente en otras magnitudes tales como fracciones de masa elemental. Para evitar resultados erróneos, los MR deben ser bien conocidos en todas sus propiedades físicas y químicas, las cuales directamente o indirectamente influyen en la magnitud certificada (Vogl, 2006).

Metodologías detalladas para productos alimenticios específicos pueden encontrarse en los Métodos Oficiales de Análisis de la AOAC Internacional.

Los métodos de determinación de humedad pueden ser considerados y diferenciados por dos tipos de procedimientos, directos e indirectos, los cuales se presentan en el cuadro 5 (AOAC, 2012).

**Cuadro 5.-** Clasificación de los métodos para la determinación de humedad.

<b>Métodos directos</b>	<b>Métodos indirectos</b>
Métodos gravimétricos	Métodos por espectroscopia
<ul style="list-style-type: none"><li>• Horno de secado</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Absorción infrarroja</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Secado por congelación</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Espectrometría de masas</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Análisis termo gravimétricos</li></ul>	Métodos electrónicos
Métodos por destilación	<ul style="list-style-type: none"><li>• Absorción de microondas</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Destilación directa</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Conductividad</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Destilación con reflujo</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Capacitancia dieléctrica</li></ul>
Método de titulación química	Refractometría
<ul style="list-style-type: none"><li>• Karl Fischer</li></ul>	Métodos crioscópicos

### **3.5.1 Métodos directos**

En los métodos directos, el análisis de humedad normalmente implica la eliminación de agua de las muestras de alimentos sólidos por secado, destilación, extracción, u otro método (Park & Bell, 2002). Se describirán solamente aquellos que se utilizaron en este trabajo:

#### **3.5.1.1 Desecación Química**

El método de desecación química se lleva a cabo con un desecador de vacío que contiene una sustancia que absorbe fuertemente la humedad, por lo general es utilizado para los alimentos secos. La cantidad de agua eliminada de los alimentos depende de la fuerza del desecante empleado. Comúnmente, la desecación de la muestra se logra a temperatura ambiente. Las técnicas de desecación son procedimientos largos y con frecuencia requieren semanas e incluso meses de la muestra para conseguir un peso constante. El tiempo de equilibrio depende en gran

medida de las fuerzas que mantienen el agua en la muestra en relación con el desecante. Los desecantes más comúnmente utilizados son pentóxido de fósforo, óxido de bario y perclorato de magnesio; un ligero calentamiento puede ser usado en conjunción con los desecantes para mejorar la eliminación de la humedad de los alimentos. Aunque este método tiene algunas limitaciones, los resultados obtenidos mediante desecación química pueden servir como estándares de referencia para calibrar los contenidos de humedad de procedimientos más rápidos (Pomeranz & Meloan, 1994).

### **3.5.1.2 Secado por congelación (liofilización)**

Es un proceso importante en la preparación de muestras y para la conservación y almacenamiento de productos biológicos, farmacéuticos y de alimentos. El secado por congelación (liofilización) es especialmente adecuado para sustancias que son sensibles al calor. Aparte de la elaboración de alimentos (por ejemplo, café, comidas completas), el secado por congelación se ha utilizado ampliamente en el desarrollo de productos farmacéuticos (por ejemplo, antibióticos) y la conservación de los productos biológicos (por ejemplo, proteínas, plasma, virus y líneas celulares). La liofilización es un proceso mediante el cual se elimina el agua u otro disolvente del material congelado mediante la conversión del agua congelada directamente en vapor, sin la formación intermedia de agua líquida.

El proceso de liofilización consta principalmente de dos pasos; el primero consiste en congelar el producto y en el segundo paso el producto es secado por sublimación directa del hielo bajo presión reducida (Orrego Alzate, 2008).

#### **3.5.1.2 1 Etapas del proceso de liofilización**

La primera etapa se lleva a cabo en congeladores independientes (separados del equipo liofilizador) o en el mismo equipo. El objetivo es congelar el agua libre del producto. Con esto se busca que el producto congelado tenga una estructura sólida, sin que exista líquido concentrado, de manera que el secado ocurra únicamente por sublimación. Cuando en el proceso de liofilización se comienza con el



calentamiento, empieza a formarse un frente de sublimación o interface entre la capa seca y la capa congelada de la muestra, el cual avanza progresivamente. La transferencia de masa ocurre por la migración de vapores a través de la capa seca de la muestra bajo la acción de una diferencia de presión (Parzanese, 2011).

### **3.5.1.2 2 Congelación y cristalización del agua**

La congelación es el proceso de conservación originado por la reducción de la temperatura por debajo de aquella en la que se comienzan a formar cristales en un alimento. En este proceso primero se verifica la eliminación del calor sensible por enfriamiento y luego se retira el calor latente durante la congelación, que es la porción energética más considerable. En los alimentos frescos debe eliminarse también el calor generado por la respiración metabólica. En seguida se elimina el calor latente de congelación, lo que provoca la formación de cristales de hielo; también se retira el calor latente de otros componentes de los alimentos, como por ejemplo el de las grasas.

### **3.5.1.2 3 Secado primario**

El material congelado se somete a la acción del vacío produciéndose la sublimación. Se debe tener en cuenta un fenómeno de transferencia térmica, ya que la sublimación es un fenómeno endotérmico, es necesario durante el proceso proporcionar calor a la masa congelada. Si este calentamiento no se efectúa, se producirá un sobre enfriamiento, dificultándose así la sublimación. Este calor aportado es necesario para compensar el enfriamiento producido por el vapor de hielo y la temperatura de equilibrio, recibe el nombre de temperatura de desecación. La desecación se producirá desde la superficie del producto expuesto al vacío hacia abajo. El otro punto crítico lo constituye la transferencia de masa y se refiere a la eliminación del vapor de agua que se produce en la sublimación. Si se considera que a la presión de 0.1 Torr un gramo de agua ocupa un volumen de 9.500 litros, se comprenderá la magnitud del problema que significa remover del sistema esta

enorme cantidad de vapor de agua. Ambos problemas inciden en la velocidad del proceso (Terroni, 1997).

#### **3.5.1.2 4 Secado secundario**

El final de la sublimación se puede apreciar por una elevación de la temperatura del producto.

Finalizado el secado primario el producto contiene generalmente una cantidad apreciable de agua, ésta permanece adsorbida en la superficie del mismo, la que es muy grande debido a su estructura porosa. Esta agua residual puede ser perjudicial para muchos productos que podrían deteriorarse al ser almacenados. Es por esta razón que se efectúa el secado secundario que corresponde a la desorción o liberación de gran parte del agua adsorbida. El secado secundario en la práctica finaliza cuando se estima que la humedad residual no afectará al producto final, asegurándole una buena conservación. Esta humedad residual se determina para cada producto.

#### **3.5.1.2 5 Equipo de liofilización**

El equipo de liofilización se conforma de 4 partes generales que se describen a continuación.

*Cámara de secado.*- Esta cámara provee al proceso un ambiente limpio y estéril, da las condiciones de presión y temperaturas exigidas para la congelación y posterior secado de la matriz.

*Condensador.*- Recoge el vapor de agua producto de la sublimación y lo congela nuevamente.

*Sistema de vacío.*- Está conectado a la cámara del condensador y proporciona las condiciones de presión indicadas para las etapas de secado primario y secundario.

*Instrumentación.*- Son de vital importancia para el control del proceso, de manera que el resultado del mismo siempre sea el mejor posible (Parzanese, 2011).

### **3.6 Contenido de humedad de los alimentos**

El agua, en un alimento existe en dos formas, conocidas como "libre" y "ligada". El agua libre existe en los espacios intergranulares y dentro de los poros del material. Tal agua sirve como un medio de dispersión para las macromoléculas hidrófilas, tales como proteínas, gomas y compuestos fenólicos para formar soluciones moleculares o coloidales y como un disolvente para los compuestos cristalinos. La segunda forma de agua se adsorbe como una capa muy fina, mono-capa o polimolecular en las superficies internas o externas de los componentes sólidos (es decir, en almidones, pectinas, celulosa y proteínas) de las fuerzas moleculares o la condensación capilar. Esta agua está estrechamente asociada con macromoléculas de absorción por fuerzas de Van der Waals o formación de enlace de hidrógeno. La tercera forma de agua en combinación química es como agua de hidratación, la llamada "agua ligada".

Una parte del agua en una muestra durante el secado se retiene por tiempos más largos a temperaturas más altas, que el resto. El intervalo de agua ligada en los alimentos es menor a 0.5 %, donde el 30 % de agua total presente, corresponde a (0.1-2.2) g/g de sólidos totales. Se debe conocer la eliminación del agua libre en lugar del agua ligada de los alimentos secos, para mejorar la estabilidad del almacenamiento (Damodaran, 2007). El aguacate contiene de (74 a 80) % de contenido de agua, comparado con la fresa que contiene del (90 al 95) % y el pescado del (65 al 81) % (Damodaran, 2007).

### **3.7 Actividad acuosa.**

La actividad acuosa, en un material es de gran importancia para sus propiedades biológicas y bioquímicas. Esto depende tanto del contenido de agua y significativamente de la naturaleza de la unión estructural de las moléculas de agua con la matriz. Así, para contenidos de agua similares, cuando son determinados por titulación Karl Fischer se obtienen actividades acuosas bastante diferentes para distintos materiales (Stoeppler, 2001).

El contenido de agua por sí sola no es un indicador viable de la caducidad de los productos alimenticios, que se debe en parte a las diferencias en la intensidad de la asociación del agua con los constituyentes no acuosos. Varios tipos de alimentos con el mismo contenido de agua difieren significativamente en lo perecedero que puedan ser. Esto es atribuible a la actividad acuosa.

El efecto de la  $a_w$  en el crecimiento de microorganismos es muy importante en los alimentos de humedad intermedia.

La  $a_w$  mínima por debajo de la cual las bacterias más importantes de alimentos no crecerán es de aproximadamente 0.90, dependiendo de la bacteria (Badui Dergal, 2006).

### **3.8 Materiales de referencia certificados (MRC)**

Como ya se mencionó, un material de referencia certificado es un material de referencia acompañado de un certificado, para el cual el valor de una (o de varias) de sus propiedades se ha certificado por medio de un procedimiento que establece su trazabilidad a una realización exacta de la unidad en que se expresan los valores de la propiedad y en el que cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con un nivel de confianza declarado (NMX-CH-160-IMNC-2006, 2006)

Un punto importante de un material de referencia es la vida de anaquel, el cual es el tiempo que permanece estable bajo condiciones apropiadas de almacenamiento. Ésta se puede mejorar dependiendo de los mecanismos naturales que afectan la estabilidad del material. Como ejemplo el reducir el contenido de humedad es uno de las primeras opciones que se toman en cuenta. En otros casos la esterilización o la pasteurización del material se pueden considerar para parar la actividad microbiana. En los materiales de referencia de estado sólido, la reducción del tamaño de partícula juega un papel muy importante.

Normalmente se reduce el tamaño de partícula debido a los métodos de medición, que son usados en la certificación y por los usuarios del MR, así como también al tomar una muestra mínima aceptable. Posterior a la reducción del tamaño de partícula el material debe ser dividido en porciones apropiadas para lo cual se

utilizan equipos subdivisores o riffers, dependiendo del tipo y tamaño de la muestra a dividir. Un requisito básico es que el método usado garantice, dentro de ciertos límites, que la primera muestra obtenida tendrá las mismas características que la última.

A pesar de todos los esfuerzos puestos en la preparación y la conservación del material, puede que haya algo de heterogeneidad e inestabilidad, la cual se debe tomar en cuenta en la estimación de incertidumbre.

Después de los estudios de homogeneidad y estabilidad viene el proceso de caracterización del material. Ésta puede llevarse a cabo mediante un solo método, el primario, el uso de varios métodos, de principios de medición diferente y por medio de un estudio inter laboratorio. En cualquier caso los resultados obtenidos con los métodos de medición usados deben ser trazables a referencias establecidas o preferentemente a las unidades del sistema internacional.

El establecimiento de la trazabilidad de los resultados de medición es esencial en un material de referencia. Como se publica en las guías ISO 30 y 35, un material de referencia puede ser certificado solamente si hay un establecimiento de incertidumbre con una trazabilidad demostrada. Entre mejor sea la ejecución de los métodos de medición, en términos de incertidumbre y trazabilidad, mejor servirá el material de referencia para los intereses de los usuarios. El método de medición utilizado para el estudio de homogeneidad debe tener buena repetibilidad. Para el estudio de estabilidad, en el que con frecuencia las muestras se miden en diferentes días, la reproducibilidad del método de medición es de suma importancia (Stoeppler, 2001).

### **3.8.1 Estudio de homogeneidad de un material de referencia**

De acuerdo a la Guía ISO 30 la homogeneidad es la condición de tener una estructura o una composición uniforme con respecto a una o más propiedades especificadas. Se dice que un material de referencia es homogéneo con respecto a una propiedad especificada si el valor de la propiedad, determinado por ensayos en muestras de tamaño especificado, se encuentra dentro de los límites de

incertidumbre definidos, aunque las muestras sean tomadas de diferentes unidades de abastecimiento (botellas, paquetes, etc.) o de una sola unidad de abastecimiento. Un estudio de homogeneidad es necesario en los proyectos de certificación por lote para demostrar que el lote de muestras (unidades) es suficientemente homogéneo. Los aspectos para asegurar la calidad son tan importantes como la determinación de la variación remanente entre frascos del lote, lo cual es un componente de la incertidumbre que se incluirá en la estimación de la incertidumbre del valor de la propiedad del MRC. El número de muestras adicionales requeridas depende principalmente del estudio de homogeneidad entre frascos (NMX-CH-165-IMNC-2008, 2008).

El número óptimo de muestras para un estudio de homogeneidad se puede determinar mediante técnicas de diseño apoyadas estadísticamente. Además, el número de frascos depende del tamaño del lote, de manera que el número de las muestras escogidas pueda considerarse “representativo” del lote entero. Este requisito se debe balancear con la incertidumbre de las mediciones que es (bajo condiciones de repetibilidad) una función de la desviación estándar de repetibilidad de la medición y del número de réplicas.

El plan de muestreo utilizado para seleccionar los frascos (unidades) para el estudio de homogeneidad puede ser aleatorio, aleatorio estratificado o en algunos casos sistemático. La estratificación es recomendada en muchas situaciones, ya que esto garantiza que los frascos seleccionados para el estudio de homogeneidad estén distribuidos equivalentemente en todo el lote (NMX-CH-165-IMNC-2008, 2008).

Se usa un análisis de varianza (ANOVA) para calcular las diferencias de las concentraciones entre botellas.

La desviación estándar entre los frascos ( $S_{bb}$ ) es calculada al usar la ecuación siguiente y los resultados son utilizados como la incertidumbre de la inestabilidad:

$$S_{bb} = \sqrt{MS_{\text{entre}} - MS_{\text{dentro}}/n}$$

Ecuación 1

Donde  $MS_{dentro}$  y  $MS_{entre}$  representan los mínimos cuadrados dentro de un grupo y entre grupos respectivamente.

Para el cálculo de la incertidumbre de la no homogeneidad la  $S_{bb}$  se calcula usando la ecuación 1. En el caso de una gran variabilidad de medición, la influencia de la variación analítica sobre la desviación estándar entre unidades ( $u_{bb}$ ) se calcula y es utilizada como el estimado para la no homogeneidad en lugar de  $S_{bb}$ . La ( $u_{bb}$ ) se calcula al usar la ecuación 2.

$$u_{bb} = \sqrt{MS_{dentro}/n} \cdot \sqrt{2/\nu} \cdot \sqrt{MS_{dentro}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $\nu$  y  $MS_{dentro}$  representa el número de grados de libertad de  $MS_{dentro}$ . La  $S_{bb}$  y la  $u_{bb}$  se calculan usando las ecuaciones 1 y 2 respectivamente y los resultados son utilizados como la incertidumbre de la no homogeneidad (Otake T, 2009).

### 3.8.2 Estudio de estabilidad

De acuerdo a la (NMX-CH-160-IMNC-2006, 2006) es la capacidad de un material de referencia, cuando se almacena bajo ciertas condiciones, para mantener un valor de una propiedad declarado dentro de los límites especificados por un periodo de tiempo.

Otro parámetro relevante con respecto a la estabilidad es la vida de anaquel del MRC. Dependiendo de la naturaleza de los mecanismos que afectan la estabilidad del material, pueden tomarse varias acciones para mejorar la vida de anaquel y/o el periodo de vigencia. El ajuste de la actividad de agua es una de las primeras opciones a considerarse, dado que la sequedad excesiva o un contenido demasiado alto de agua puede desestabilizar el material. En muchos casos, la humedad juega un papel dominante en los mecanismos que conducen a la inestabilidad de la matriz y/o de los parámetros.

Hay dos tipos de estabilidad:

A corto plazo, es la estabilidad de una propiedad de un material de referencia durante su transporte bajo condiciones especificadas

Estabilidad a largo plazo, es la estabilidad de una propiedad de un material de referencia bajo condiciones de almacenamiento especificadas por el productor del MRC.

Otro concepto importante que se debe conocer es el tiempo de vida de un material de referencia, es el intervalo de tiempo durante el cual un material de referencia puede ser utilizado.

La vida de anaquel de un MR/MRC, es el intervalo de tiempo durante el cual el productor del MRC garantiza su estabilidad.

Para alcanzar la estabilidad a largo plazo evitando cambios biológicos, físicos y químicos, es indispensable eliminar la humedad para la mayoría de los materiales de referencia sólidos. Así que es común en la práctica aplicar diferentes técnicas de secado para matrices biológicas conteniendo analitos orgánicos y organometálicos. El procedimiento de secado es con frecuencia seguido por irradiación gamma para proteger contra el ataque microbiano.

### **3.9 Métodos de análisis cromatográficos.**

Para realizar la extracción de residuos de plaguicidas en alimentos, se han implementado técnicas, tales como: extracción sólido-líquido o líquido-líquido, QuEChERS, extracción con fluidos supercríticos, extracción con líquidos presurizados, extracción asistida con microondas, extracción en fase sólida y micro-extracción en fase sólida. Cualquier técnica de extracción a emplear en el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos debe maximizar la recuperación de los analitos y minimizar las interferencias.

En (Annastasiades, 2003) desarrollaron un método de extracción simple para residuos múltiples de muestras de alimentos, conocidos como QuEChERS para optimizar procedimientos de extracción y limpieza con un énfasis en la minimización de costos, tamaño de la muestra y el tiempo de preparación. QuEChERS implica la extracción de plaguicidas de una muestra de material compuesto, se homogeneiza usando acetonitrilo y cloruro de sodio en un tubo de centrifuga, seguido de un paso de limpieza de fase sólida de dispersión realizado en un segundo tubo de ensayo



que contiene sorbentes para quitar componentes que interfieren en la matriz (Narong, 2013).

Se logró una excelente sensibilidad para los plaguicidas de residuos múltiples en diversas matrices vegetales utilizando tanto el GC-MS/MS y LC-MS/MS (Olusegun, 2013).

La última etapa en el procedimiento analítico es la identificación de los compuestos y su determinación cuantitativa usando instrumentación apropiada. Las técnicas usuales para determinaciones finales de plaguicidas incluyen la cromatografía de gases con diferentes detectores selectivos, la cromatografía de líquidos de alta resolución (usualmente en modo de fase inversa) con detector de arreglo de diodos y detector de fluorescencia (Fenik, 2011) y la espectrometría de masas tandem acoplada a sistemas de cromatografía tales como CG-MS/MS y LC-MS/MS, que funciona en modo Multiple Reaction Monitoring (MRM).

Durante las dos últimas décadas, los instrumentos de GC/MS principalmente en un solo cuadrupolo MS, trampas de iones y más recientemente también de triple cuadrupolo MS/MS se han convertido en herramientas primarias determinantes en la mayoría de los laboratorios de plaguicidas. Han reemplazado al CG con detectores convencionales y ha permitido la identificación y cuantificación simultánea de una gama más amplia de analitos susceptibles al CG, independientemente de su composición elemental.

Cabe señalar que la aplicación de LC/MS también ha mejorado el análisis de ciertos plaguicidas, tales como insecticidas organofosforados más polares (por ejemplo, acefato, metamidofos, ometoato, dimetoato, dicrotofos, monocrotofos, malaoxón, paraoxón), que han sido tradicionalmente incluidos en los métodos de residuos múltiples basados en CG porque no había otra manera de analizarlos fácilmente de modo multi-residuos.

El método QuEChERS original se evaluó inicialmente sólo para un número limitado de analitos representativos, la mayoría plaguicidas susceptibles a CG. Estudios posteriores con un mayor número de analitos mostraron que ciertos analitos sensibles al pH pueden dar recuperaciones menores debido a su estabilidad más

baja o a pérdidas durante la etapa de partición, dependiendo del pH de la matriz de la muestra.

Las pérdidas durante la etapa de partición pueden ocurrir en el caso de plaguicidas ácidos (por ejemplo, imidazolina ácida, herbicidas piridincarboxílicos o fenoxicarboxílicos ácidos), en matriz neutral/menos ácida, o en el caso de los plaguicidas básicos (por ejemplo, carbendazim, imazalil, pimetrozina, o tiabendazol) a un pH inferior (en matrices ácidas) cuando una porción de las moléculas del analito pueden estar en una forma iónica (anión o catión, respectivamente) y la partición en la capa acuosa.

Para remediar estos problemas para el método de residuos múltiples en todo el alcance de aplicación que cubre estos analitos problemáticos, es importante: (i) acidificar el extracto final (a  $\approx 0.1$  % de contenido de ácido acético o de ácido fórmico) para mejorar la estabilidad de los analitos sensibles a las bases y (ii) utilizar una disolución amortiguadora de pH  $\approx 5$  durante el proceso de extracción, para proporcionar recuperaciones óptimas para la mayoría de los analitos sensibles al pH.

El método QuEChERS original para las frutas y hortalizas (muestras con más de 80 % de contenido de agua) se basa en la extracción de acetonitrilo y la partición de acetonitrilo y capas de agua (procedentes de la muestra) inducidas por la adición de una mezcla de sales de sulfato de magnesio anhidro ( $\text{MgSO}_4$  anh.) y cloruro de sodio (NaCl) 4:1 (w/w)

Después de una agitación vigorosa y centrifugación, una parte de la alícuota del extracto de acetonitrilo se limpia utilizando extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) con 150 mg  $\text{MgSO}_4$  anh. y 25 mg de sorbente de amina primaria/ secundaria (PSA) por un mL de extracto. Después de la centrifugación, el extracto está listo para el análisis GC/MS y LC/MS (la dilución acuosa se realiza típicamente antes por LC/MS).

Los siguientes componentes son utilizados en la limpieza de los extractos por el método QuEChERS.

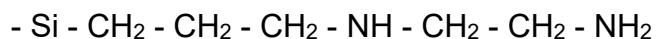
### **(1) MgSO<sub>4</sub> anhidro**

Se añade al extracto crudo para propósitos de secado, para reducir significativamente la cantidad de agua en el extracto del acetonitrilo, que podría afectar a la limpieza de la SPE y la determinación por CG.

La eliminación de agua afecta debido a que disminuye la polaridad de los extractos de acetonitrilo, bajando la solubilidad y precipitación de más co-extractivos polares, tales como los pigmentos de antocianinas en ciertas frutas.

### **PSA**

El PSA es un sorbente con la siguiente estructura de amina primaria y secundaria:



Se utiliza principalmente para eliminar los compuestos con grupos carboxílicos, tales como ácidos grasos u otros ácidos orgánicos presentes en la matriz de la muestra, pero también puede eliminar los compuestos con grupos carbonilo, tales como azúcares.

Grandes cantidades de PSA (> 50 mg por 1 ml de extracto) pueden conducir a menores recuperaciones de ciertos plaguicidas con grupos carbonilo, como acefato, quinometionato, cletodim, hexitiazox, o setoxidim. Esto es especialmente cierto si se emplea para matrices con un contenido menor de coextractivos de matriz ácida, lo que haría competir con ellos por los sitios activos en el sorbente PSA. Del mismo modo, cantidades más grande de PSA (y mayor contacto con él) pueden causar degradación de analitos de bases sensibles debido a la eliminación de los ácidos del extracto.

### **C18**

Los sorbentes a base de sílice de fase inversa, tales como el octadecilo (C18) pueden ser añadidos de forma segura en la etapa de dSPE a 50 mg por 1 ml de

extracto para eliminar componentes de la matriz altamente lipofílicos, tales como esteroides o ceras, sin poner en peligro las recuperaciones de los plaguicidas.

### **GCB (negro de carbón grafitado)**

Adsorbe compuestos con estructura plana. Por lo tanto, se puede añadir a la etapa de dSPE utilizado para la eliminación de ciertos pigmentos (carotenoides y clorofila), esteroides, y otros coextractivos de matriz planar potencialmente presentes en el extracto de la muestra.

### **Estándar interno**

El uso de estándares internos adecuados es una buena práctica analítica para mejorar la precisión y la veracidad. En el método QuEChERS, el estándar interno se adiciona a la muestra justo después del solvente de extracción para el control volumétrico de todo el proceso analítico. Se recomienda esto porque la señal de normalización del estándar interno puede corregir errores y fluctuaciones volumétricas cuando se trata de la adición del disolvente de extracción a la muestra o el volumen inyectado en la etapa determinante.

Un estándar interno adecuado debe tener las siguientes cualidades:

- ▶ muy buena estabilidad y recuperación independientemente del pH de la matriz, el contenido de grasa, o la opción de limpieza (por ejemplo, el uso de GCB).
- ▶ que no esté presente como un residuo en ninguna muestra.
- ▶ disponible como material puro a un precio razonable.
- ▶ que represente bien los analitos en el sistema cromatográfico dado. Por ejemplo, paratió-d10 puede ser usado como estándar interno para plaguicidas recomendables por CG para controlar todo el proceso analítico.

(Mastovska, 2013).

**Cuadro 6.-** Propiedades de disolventes comunes utilizados en el análisis de residuos de plaguicidas.

<b>Disolvente</b>	<b>Constante dieléctrica, <math>\epsilon</math></b>	<b>Índice de polaridad</b>	<b>Viscosidad (mNsm<sup>-2</sup>)</b>	<b>Punto de ebullición (°C)</b>	<b>Solubilidad en agua (% w/w)</b>
Agua	78.5	9.0	1.0	100.0	-
Acetonitrilo	37.5	5.8	0.37	81.6	100
Acetona	20.7	5.1	0.32	56.2	100
Metanol	32.6	5.1	0.60	64.6	100
Etanol	24.3	5.2	1.2	78.4	100
Acetato de etilo	6.0	4.4	0.45	77.2	8.7
Eter dietílico	4.3	2.8	0.24	34.6	6.9
Diclorometano	9.1	3.1	0.44	40.7	1.6
Tolueno	2.4	2.4	0.52	110.8	0.05
Ciclohexano	2.0	0.2	0.98	80.7	0.01
Hexano	1.9	0.0	0.32	69.0	0.001

(Lehotay, 2006).

#### **IV. HIPÓTESIS**

Se obtendrá un lote candidato a material de referencia de plaguicidas en aguacate, mediante un desarrollo metodológico, controlando variables en el proceso de liofilización tales como el vacío, la temperatura y el tiempo, así como en la homogeneización el tamaño de partícula.

#### **V. OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar la metodología para la obtención de un candidato a material de referencia de plaguicidas en aguacate.

#### **VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Exponer plantas de aguacate a plaguicidas.
- Seleccionar los frutos expuestos para determinar la exposición a plaguicidas.
- Obtener un lote homogéneo de las muestras de aguacate liofilizado.
- Desarrollar una metodología para la extracción de los plaguicidas en aguacate
- Desarrollar la metodología para medir la fracción de masa de los plaguicidas en el candidato a material de referencia.
- Obtener un candidato a material de referencia.

#### **VII. METODOLOGIA**

##### **7.1 Exposición de plantas de aguacate a plaguicidas**

**Localización de los árboles.** Los árboles de aguacate se expusieron a algunos plaguicidas, éstos están ubicados en México, en el estado de Michoacán (Rancho las Pilas, Aputzio de Juárez, Michoacán, México (Figura 5).

La localidad se encuentra a una mediana altura de 2010 metros sobre el nivel del mar.



**Figura 2.-** Rancho las Pilas, Zitácuaro, Mich., México.

### 7.1.1 Tipo de plaguicidas aplicados.

Los plaguicidas que se aplicaron fueron los 8 que se encuentran en el cuadro 7, en la dosis que se muestra.

**Cuadro 7.-** Cantidades sugeridas a adicionar de los plaguicidas en el árbol de aguacate.

<b>Plaguicida</b>	<b>Dosis en 20 L de agua</b>
Acefato	60 g
Carbendazim	50 mL
Dimetoato	35 mL
Lambda-Cialotrina	50 mL
Malatión	50 mL
Metamidofos	100 mL
Paratión metílico	25 mL
Permetrina	5 mL

### 7.1.2 Método y períodos de aplicación

Los plaguicidas fueron adicionados semanalmente a los árboles por el método de aspersión directa a las hojas, tallos y frutos en un periodo de aproximadamente 4 meses. El Cuadro 8 muestra los plaguicidas adicionados de manera individual y el cuadro 9 muestra los plaguicidas adicionados y la secuencia de la adición de los mismos para contar con lotes de mezcla de plaguicidas.

**Cuadro 8.-** Tipo de plaguicidas individuales, identificación y código.

<b>Plaguicidas</b>	<b>Identificación</b>	<b>Código individual</b>
Acefato	A	1i
Carbendazim	C	2i
Dimetoato	D	3i
Lambda-Cialotrina	L	4i
Malatión	Ma	5i
Metamidofos	M	6i
Paratión	Pa	7i
Permetrina	P	8i

**Cuadro 9.-** Identificación de la mezcla y secuencia de la aplicación de cada plaguicida.

<b>Mezcla</b>	<b>Plaguicidas adicionados por semana</b>
1m	Pa,M,M,Pa,L,L,C,C,C,P,P,A,A,Ma
2m	P,P,L,L,Ma,Ma,D,D,A,C,C,A,A
3m	L,L,D,D,A,A,P,P,C,C,Ma,Ma,D,M,M,Pa,L
4m	D,L,L,C,M,M,A,A,Ma,Ma,C,C,P,P,L,D,Pa,A,A
5m	A,Ma,Ma,P,P,A,L,L,Pa,Pa,D,D,Ma,Ma,C,C,M,P,A
6m	M,M,A,A,P,P,C,C,L,L,Pa,Pa,D,D,Ma,Ma,M,C,A,A

### 7.1.3 Árboles control.

Como control negativo/blanco, se utilizaron los frutos de plantas que no se trataron y que se encontraban en otra parte de la huerta, localizados a 2 km aproximadamente de los árboles expuestos.

### 7.1.4 Materiales y equipos utilizados

Los equipos utilizados durante el proceso de preparación de los materiales de referencia de aguacate liofilizados se encuentran en el cuadro 10.



**Cuadro 10.-** Equipos utilizados en la preparación de los materiales de referencia de aguacate liofilizado.

<b>Instrumento</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
Procesador de alimentos	Robot Coupe	RSI 6V
Liofilizadora	Virtis	50L ultra EL-85
Báscula	OHAUS	s/m
Divisor rotatorio de conos con alimentador vibratorio	FRITSCH	PT100
Congelador	Thermo Scientific	UXF40086A60
Congelador vertical	Thermo FC	PEEK
Molino vertical	RETSCH	SM 300
Balanza analítica	Sartorius 6200 g	LC6201S
Tamizador	Orto Alresa	OA SS203
Tamizador	Retsch	AS200
Selladora con ajuste p/vacío	Audion	UMS-93
Limpiador ultrasónico de acero inoxidable en una sola carcasa	Fritsch	
Thermohigrobarómetro	VWR	20367570
Cromatografo de gases	Marca Agilent	Mod.6890N
Detector selectivo de masas	Mca. Aligent	Mod. 5973
Centrifuga refrigerada		
Balanza analit.electr.digital		
Evaporador de nitrógeno		
Cuchillo de tipo carnicero		
Tabla para picar de plástico		
Charolas de acero inoxidable		
Mallas de acero de 1000 micrómetros		
Frascos de vidrio		
Espátula		

## **7.2 Selección de los frutos expuestos para la determinación del nivel de exposición a plaguicidas, de acuerdo a los criterios de maduración.**

### **7.2.1 Muestreo de frutos de aguacate.**

Una vez que se aplicaron los plaguicidas a los árboles de aguacate, se realizó el muestreo de los frutos de una manera aleatoria y éstos se tomaron de los árboles identificados previamente.



**Figura 3.-** Árboles identificados.

### **7.2.2 Selección de los aguacates.**

Se seleccionaron los frutos de acuerdo a su nivel de madurez, se eligieron aquellos que tuvieron una consistencia firme y un tamaño de aproximadamente 150 g, se colocaron en una rejilla de plástico, con un letrero que contenía el número del árbol y el plaguicida o la mezcla de plaguicidas que se aplicaron y se transportaron al CENAM para su procesamiento. Una vez en el CENAM se partieron en rodajas, se les quitó la semilla y se trituraron en un procesador de alimentos. Posteriormente se colocaron en el ultra congelador.



**Figura 4.-** Selección de aguacates de la huerta.

### **7.3 Obtención de un lote homogéneo de las muestras de aguacate liofilizado.**

#### **7.3.1 Identificación de las mejores condiciones de liofilización, vacío, temperatura y tiempo.**

En el proceso de liofilización se empleó una liofilizadora marca Virtis, modelo 50L ultra EL-85. Éste se llevó a cabo de la siguiente manera:

Una vez congelado el producto se introdujeron las charolas a la liofilizadora, se colocaron los detectores de temperatura en algunas de ellas, se cerró herméticamente la liofilizadora, así como la puerta del condensador y se colocó el programa de liofilización más adecuado, iniciando con la elección de la temperatura en la etapa de tratamiento térmico, las temperaturas en las fases de congelación, condensación y el vacío; en la etapas del ciclo de secado, la elección de la temperatura, tiempo, si se mantiene o se hace una rampa y la elección del vacío; en la programación secundaria, la temperatura, el tiempo y el vacío.

Algunos lotes de aguacates se sometieron al proceso de liofilización seleccionando y mejorando las condiciones de este proceso hasta elegir las mejores, con las cuales se trabajó.

#### **7.3.2 Identificación de las mejores condiciones de molienda del fruto aguacate.**

Se seleccionó el molino y la malla con los cuales el producto no se aglomeró, así como las rpm a las que se trabajaría el molino para obtener una consistencia adecuada del producto.

#### **7.3.3 Molienda de frutos de aguacate con base a las mejores condiciones.**

Para la molienda se utilizó, un molino de cuchillas vertical SM-300 marca Retsch a 800 rpm. El proceso de molienda se llevó a cabo adicionando el producto al molino en el que se colocó la malla de 1 000  $\mu\text{m}$  y se recolectó el aguacate molido en un recipiente de acero inoxidable.

Se almacenó en frascos de vidrio, los cuales se sellaron con parafilm y se colocaron en cajas de plástico de 30 cm x 50 cm x 40 cm, conteniendo costales de manta

rellenos con un desecante, para conservarlos secos, mientras se continuaba con el proceso de tamizado y homogenización.

#### **7.3.4 Determinación del nivel de tamizado de las muestras molidas de frutos de aguacate.**

Se utilizó un tamizador marca Retsch automático. Se usaron tamices o mallas de tamaño de partícula de 1 000  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$  y 250  $\mu\text{m}$ , con la finalidad de elegir, el tamaño de partícula idóneo en donde se encontraba la mayor fracción de masa de los plaguicidas. Se recomienda hacerlo pasando dos veces el producto a través de los tamices para tener mayor contenido de la fracción de interés (250  $\mu\text{m}$ ) y por lo tanto un mayor rendimiento.

Se colocaron las mallas en el tamizador y se procedió a realizar el tamizado de las mismas por periodos de 10 minutos cada uno.

Una vez tamizado el producto, se almacenaron los diferentes tamaños de partícula en frascos de vidrio de 500 g cada uno, sellándolos con parafilm y empacándolos en bolsas aluminizadas (marca mylar) al vacío, para su conservación, mientras se envasaban de manera individual.

#### **7.3.5 Homogenización de las muestras de fruto de aguacates, molido y tamizado.**

El proceso de subdivisión de la muestra se realizó enumerando 2 juegos de frascos recolectores del 1 al 8, ocho fueron colocados en el divisor y los otros 8 fueron los recolectores. Se colocó el producto en el subdivisor rotatorio, subdividiendo la muestra en ocho partes (frascos de aproximadamente 100 g de muestra liofilizada); la muestra subdividida se colocó en el frasco recolector con el número correspondiente. En la siguiente ronda la muestra del frasco uno se colocó en el frasco dos y la muestra del frasco dos, en el frasco tres y así sucesivamente hasta terminar con el producto, la figura 5 muestra la subdivisión realizada.

División	No. de frasco									No. de frasco
1a	1	1a	1b	1c	1d	1e	1f	1g	1h	A
2a	2	2h	2a	2b	2c	2d	2e	2f	2g	B
3a	3	3g	3h	3a	3b	3c	3d	3e	3f	C
4a	4	4f	4g	4h	4a	4b	4c	4d	4e	D
5a	5	5e	5f	5g	5h	5a	5b	5c	5d	E
6a	6	6d	6e	6f	6g	6h	6a	6b	6c	F
7a	7	7c	7d	7e	7f	7g	7h	7a	7b	G
8a	8	8b	8c	8d	8e	8f	8g	8h	8a	H

**Figura 5.-**Proceso de subdivisión.

### **7.3.6 Obtención de un lote homogéneo conteniendo producto de fruto de aguacate.**

#### **7.3.6.1 Envasado de las unidades del lote.**

De cada uno de los frascos recolectores se tomaron 10 g de aguacate liofilizado y se adicionaron a los envases ámbar en los cuales se colocó el aguacate, para ello se utilizó una balanza granataria, se puso el sello de garantía y la etiqueta correspondiente a cada frasco, para su identificación.

#### **7.3.6.2 Empacado del lote**

Posteriormente se colocaron en bolsas aluminizadas y se sellaron al vacío, poniendo la etiqueta en la parte externa de la bolsa para la identificación del material de referencia. Una vez envasados los frascos con el aguacate, éstas fueron almacenadas en congeladores a – 50 °C.

#### **7.3.6.3 Medición de humedad por desecación química**

La determinación del contenido de humedad se realizó de acuerdo al procedimiento de la AOAC internacional para la determinación de humedad por medio de desecación química.

Se introdujeron las charolas (previamente limpias), en la estufa a una temperatura de 100 °C por un tiempo de 3 horas, una vez transcurrido el tiempo, se pasaron a un desecador para dejarlas enfriar por 1 hora. Pasado el tiempo, se pesaron y se marcaron para identificarlas durante el proceso de peso constante, se registraron los pesos. Éstos se corrigieron por empuje del aire. Este procedimiento se llevó a cabo hasta obtener un peso constante con un criterio de peso constante de 0.0004 g.

El método de desecación química consistió en lo siguiente: Una vez que se obtuvo el peso constante de las charolas, se le agregó aprox. 1 g de material de referencia de control (DMR-489a de plaguicidas en lechuga) en una charola y 1 g de DMR-516a que es el material de referencia de plaguicidas a medir en cada una de las 6 charolas y se introdujo otra charola vacía adicional como muestra “control negativo/blanco”, se registraron los pesos iniciales y se introdujeron al desecador con perclorato de magnesio  $Mg(ClO_4)_2$  el cual funciona como desecante; al quinto día se pesaron las charolas para obtener una diferencia en los pesos y determinar la humedad que se perdió en ese periodo, después se pesaron cada tercer día registrando los pesos y comparándolos con la pesada anterior hasta obtener el peso constante, el peso se corrige por empuje del aire, se inició pesando las 8 charolas en una misma pesada, se observó que las charolas que se pesaron al final en lugar de perder peso lo ganaban, al exponerse a la humedad del aire en ese tiempo, por lo que se decidió pesar tres charolas en cada pesada para reducir ese efecto.

Las muestras en el desecador se aprecian en la figura 6.



**Figura 6.-** Muestras en el desecador.

#### **7.3.6.3.1 Cálculo del contenido de humedad**

Se registraron los pesos de las muestras en diferentes días pesando tres charolas por cada día de pesado, debido a que al pesar las 8 charolas en un mismo día se observó un comportamiento de hidratación de la muestra en las charolas pesadas al final, provocado por la exposición al aire en el momento de abrir y cerrar el desecador durante el pesado, dando como resultado que no se obtuviera una disminución de pesos o incluso que éste aumentara debido a la absorción de humedad contenida en el aire, al momento de pesar.

Conforme se fueron registrando los datos se calculó el contenido de humedad determinado por diferencia de pesos utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de humedad} = \left( \frac{m_1 - m_2}{m_1} \right) \times 100$$

Donde:

$m_1$  = masa del sólido húmedo

$m_2$  = masa del sólido seco

Con los valores obtenidos se elaboró una gráfica de humedad determinada en función del tiempo con la cual se pudo determinar el momento en que se llegó al contenido de humedad final, teniendo un comportamiento de valores constantes de humedad.

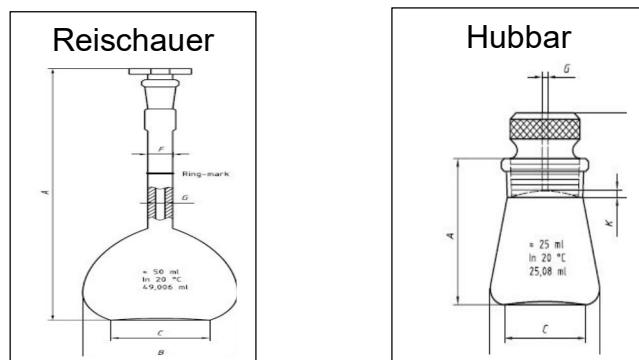
### 7.3.6.4 Medición del tamaño de partícula

Para determinar el tamaño y la distribución de partículas se introdujeron las submuestras dispersadas en etanol, una a la vez en el analizador, se hicieron tres repeticiones de medición para cada una de ellas, para alcanzar un total de 9 mediciones para cada muestra. Se utilizó el instrumento marca Malvern, modelo Mastersizer X, el cual para medir hace uso de la teoría de dispersión de Mie y de Fraunhofer, un haz de luz láser incide sobre una muestra en movimiento, la cual dispersa la luz y produce patrones de difracción que corresponden a los tamaños de partícula detectados.

### 7.3.6.5 Medición de la densidad

Se realizó usando un picnómetro el cual se recomienda para densidad de sólidos o líquidos. El picnómetro, o botella de gravedad específica, es un frasco con un cierre sellado fabricado de vidrio metal o plástico que dispone de un tapón provisto de un fino capilar con el fin de obtener un volumen constante con gran precisión (a una temperatura de referencia), lo anterior permite medir la densidad de distintos fluidos o sólidos utilizando el mismo picnómetro.

Para la determinación de la densidad de algunos productos especiales como sólidos o polvos, se utilizan picnómetros metálicos o de vidrio con un diseño de boca ancha que facilita el llenado del material a medir; estos instrumentos son del tipo Hubbard o Reischauer.



**Figura 7.-** Picnómetros utilizados para medir densidad de sólidos o polvos.



La densidad de partículas de un árido (polvo, por ejemplo), que no puede determinarse con el método de pesada hidrostática, densímetro de inmersión o densímetro digital, puede obtenerse con el picnómetro. El proceso para la medición de la densidad con el uso de un picnómetro calibrado consiste en:

- Limpiar perfectamente el instrumento (incluyendo el tapón).
- Secar con un solvente para evitar humedad.
- Determinar la masa del picnómetro vacío utilizando el instrumento para pesar (balanza).
- Llenar el picnómetro con el polvo a medir.
- Llevar el picnómetro lleno a la temperatura de medición.
- Rebosar con el polvo muestra el capilar del picnómetro.
- Rasar la boca del capilar con una placa de vidrio, el exceso del material en medición.
- Eliminar el exceso de polvo del cuerpo del picnómetro, por la parte externa, utilizando papel que no desprenda fibras.
- Determinar la masa del picnómetro lleno del polvo a medir con un instrumento para pesar.

La densidad del polvo (asociada a una temperatura y presión atmosférica) se obtuvo de la diferencia del picnómetro lleno con la muestra y vacío dividido entre el volumen interno del picnómetro patrón.

#### **7.4 Desarrollo de una metodología de medición.**

Todos los aspectos en un proceso analítico son igualmente importantes y ninguna etapa puede mejorar la calidad de la etapa previa en el procedimiento.

La preparación de la muestra es un paso muy importante dentro del proceso de medición de los plaguicidas, consiste de las etapas de homogenización, extracción y limpieza.

#### **7.4.2 Desarrollo del método de extracción de los plaguicidas en el aguacate.**

##### ***Extracción de fase sólida QuEChERS modificado.***

Las muestras se obtuvieron usando un muestreo aleatorio estratificado, se aatemperaron, se agitaron para homogeneizarlas y se tomó una cantidad de muestra de 2 g, se midieron 3 submuestras.

El método de extracción se basó en el QuEChERS modificado de la referencia citada (Narong, 2013). A continuación se describe el método utilizado:

Se pesaron 2 g de la muestra (material de referencia control negativo/blanco, sin plaguicidas, blanco fortificado y MR de plaguicidas) en tubos de centrifuga; para el blanco fortificado, se adicionaron los plaguicidas de interés (lambda cialotrina, permetrina cis, permetrina trans y el estándar interno deltametrina) y a la muestra se agregó la deltametrina; se adicionaron 15 ml de acetonitrilo y 5 mL de agua, se esperó unos minutos, se agitó con el vortex hasta que se disolvieron las soluciones, se sonicaron por 15 min y se centrifugaron por 15 min a 4 °C a 5 000 rpm, la parte líquida se pasó a un tubo al que se le adicionó 1 g de cloruro de sodio, se agitó y esperó a que se separaran las dos fases, se tomó la fase orgánica y se pasó a otro tubo para almacenarlo y posteriormente hacerle la limpieza. Mientras tanto al sedimento de aguacate remanente se le añadieron 10 ml de acetona para hacerle una segunda extracción, se agitó nuevamente en el vortex, se sonicaron por 15 min, se centrifugó, una vez obtenida la segunda extracción, se pasó el líquido al tubo donde se colocó la parte de la fase orgánica y se almacenó para hacerle la limpieza. Al sedimento de aguacate nuevamente se le añadieron 10 ml de acetona para hacerle una tercera extracción, se agitó en el vortex, se sonicó por 15 min, se centrifugó, una vez obtenida la tercera extracción, se pasó el líquido al tubo en el que se almacenaron las dos extracciones anteriores, se homogenizaron usando un vortex, se dejó reposar por 1 min y se le hizo el proceso de limpieza siguiente:

Se adicionaron los sorbentes comerciales para muestras grasas<sup>1</sup>, se agitó con vortex, se centrifugó y la parte líquida se pasó a otro tubo con los sorbentes para muestras con pigmentos<sup>2</sup>, se agitó con vortex, se centrifugó y se pasó por un

acrodisco, se evaporó a 1 mL a 40 °C usando un evaporador con N<sub>2</sub> gas y se colocó en un vial para su medición por GC/MS/MS (Narong, 2013).

<sup>1</sup> Sorbentes para grasas QuEChERS, contienen comercialmente lo siguiente:

600 mg de MgSO<sub>4</sub>  
200 mg PSA  
200 mg C18

<sup>2</sup> Sorbentes para pigmentos QuEChERS

600 mg de MgSO<sub>4</sub>  
200 mg PSA  
200 mg GCB (carbón activado)

### ***Desarrollo y optimización del método de extracción de fase sólida.***

Se desarrolló un nuevo método de extracción para mejorar el porcentaje de extracción de los plaguicidas de interés debido a que el método QuEChERS aplicado no satisfizo los requerimientos metrológicos de 90 % para todos los plaguicidas. Con este fin se llevó a cabo el proceso de extracción cambiando los disolventes tanto de la primera, segunda y tercera extracción, con la finalidad de conocer bajo qué condiciones se obtenía un mayor porcentaje de recuperación. El proceso se realizó de la siguiente manera: Se pesaron 2 g de la muestra (material de referencia control negativo/blanco (sin plaguicidas), blanco fortificado y MR de plaguicidas en tubos de centrifuga; para la muestra fortificada se adicionaron los plaguicidas de interés (lambda cialotrina, permetrina cis, permetrina trans y el estándar interno deltametrina), para la muestra se adicionó la deltametrina, se adicionaron 15 ml de acetonitrilo\* y 5 mL de agua, se esperó unos minutos, se agitó con el vortex hasta que se disolvieron las soluciones, se sonicaron por 15 min y se centrifugaron por 15 min a 4 °C a 5 000 rpm, la parte líquida se pasó a un tubo al que se le adicionó 1 g de cloruro de sodio, se agitó y esperó a que se separaran las dos fases, se tomó la fase orgánica y se pasó a otro tubo para hacer la limpieza.

La limpieza se hizo de la siguiente manera: Se adicionaron los sorbentes comerciales para muestras grasas<sup>1</sup>, se agitó con vortex, se centrifugó y la parte líquida se pasó a otro tubo con los sorbentes para muestras con pigmentos<sup>2</sup>, se agitó con vortex, se centrifugó y se pasó por un acrodisco, se evaporó hasta tener 1 mL del extracto, se colocó en el vial para su medición por GC/MS/MS, se registró como 1a. extracción.

Mientras tanto al sedimento de aguacate remanente se le añadieron 10 ml de acetona\* para hacerle una segunda extracción, se agitó nuevamente en el vortex, se sonicó por 15 min, se centrifugó, una vez obtenida la segunda extracción, se pasó el líquido a otro tubo y se le hizo el proceso de limpieza anteriormente mencionado. Una vez limpio y evaporado se colocó en un vial para su medición por GC/MS/MS, se registró como 2a. extracción.

Al sedimento de aguacate nuevamente se le añadieron 10 ml de acetona\* para hacerle una tercera extracción, se agitó nuevamente en el vortex, se sonicó por 15 min, se centrifugó, una vez obtenida la tercera extracción, se pasó el líquido a otro tubo y se le hizo el proceso de limpieza siguiente:

Se adicionaron los sorbentes comerciales para muestras grasas<sup>3</sup>, se agitó con vortex, se centrifugó y la parte líquida se pasó a otro tubo con los sorbentes para muestras con pigmentos<sup>4</sup>, se agitó con vortex, se centrifugó y se pasó por un acrodisco, después se evaporó hasta tener 1 mL del extracto y se colocó en el vial para su medición por GC/MS/MS, se registró como 3a. extracción.

Sorbentes para grasas QuEChERS, contienen comercialmente lo siguiente:

1200 mg de MgSO<sub>4</sub>  
400 mg PSA  
400 mg C18

Sorbentes para pigmentos QuEChERS, contienen comercialmente lo siguiente:

1200 mg de MgSO<sub>4</sub>  
400 mg PSA  
400 mg GCB (carbón activado)

<sup>1</sup> Para la 1a. y 2a extracción

Sorbentes para grasas QuEChERS

600 mg de MgSO<sub>4</sub>  
200 mg PSA  
200 mg C18

<sup>2</sup> Sorbentes para pigmentos QuEChERS

600 mg de MgSO<sub>4</sub>  
200 mg PSA  
200 mg GCB (carbón activado)

3a. y 4a. extracción

<sup>3</sup> Sorbentes para grasas QuEChERS

300 mg de MgSO<sub>4</sub>  
100 mg PSA  
100 mg C18

<sup>4</sup> Sorbentes para pigmentos QuEChERS

300 mg de MgSO<sub>4</sub>  
100 mg PSA  
100 mg GCB (carbón activado)

\*Este disolvente se cambia en el método de extracción al realizar la optimización del mismo, se utilizaron los disolventes que se encuentran en el cuadro 6 del punto 3.9.

## **7.5 Desarrollo de la metodología para medir la fracción de masa de los plaguicidas en el candidato a material de referencia**

La medición de la fracción de masa de los plaguicidas en el candidato a material de referencia se realizó mediante la técnica de cromatografía de gases/espectrometría de masas/masas, triple cuadrupolo.

Se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent 7890 GC acoplado a un espectrómetro de masas Agilent modelo 7000 triple cuadrupolo MS, con fuente de ionización de masas de impacto electrónico (IE), con extractor (alta sensibilidad) y

un automuestreador Agilent 7693A muestreador líquido automático (ALS) que consta de un Backflushing unión última de purga controlado por un módulo de control neumático; se usó como gas acarreador helio y dos columnas Agilent HP-5MS UI. El espectrómetro de masas fue operado en ionización de impacto electrónico, con una energía de ionización de 70 eV, a una temperatura en la fuente de iones de 230 °C, temperatura del cuadrupolo de 150 °C, temperatura de la línea de transferencia de 230 °C, retardo del solvente (Solvent delay) de 4.0 min, gas He para enfriar con flujo de 2.25 mL/min, flujo de gas de colisión N<sub>2</sub> de 1.5 mL/min, con un barrido total de 50 m/z a 350 m/z y un modo de adquisición de monitoreo de reacción múltiple (MRM) y amplia resolución MS1/MS2.

El cromatógrafo de gases trabajó con dos columnas de 15 m x 250 µm x 0.25 µm, de 0 °C a 350 °C, columna 1: flujo: 0.907 mL/min, presión: 8.3119 psi; columna 2: flujo: 1.107 mL/min, presión: 2.3617 psi, temperatura del inyector de 280 °C y un programa en el horno de 60 °C, 1 min, 40 °C/min, 170 °C, 0 min, 10 °C/min, 310 °C, 3 min, con un tiempo de la corrida de 20.75 min y una post-corrída de 5.0 min a 310 °C, el volumen de inyección fue de 1 µL. Las concentraciones de cada compuesto se determinaron al comparar las áreas de los picos en las muestras con las de las mezclas de plaguicidas de los estándares de concentración conocida.

El análisis fue llevado a cabo con monitoreo de ion seleccionado (SIM), utilizando 3 iones precursores con sus respectivos iones producto.

Se prepararon disoluciones de los plaguicidas a aproximadamente 10 mg/kg usando acetona como disolvente. Se realizó una curva de calibración de 5 puntos, usando el material de referencia control negativo/blanco adicionado con las disoluciones de plaguicidas elaboradas previamente de lambda cialotrina, permetrina cis, permetrina trans y como estándar interno deltametrina.

Las muestras fueron adicionadas con el estándar interno y extraídas con el método anteriormente mencionado, se midieron en el cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas/masas de la siguiente manera:

Cada vez que se hizo la medición se realizó el auto scan con el propósito de que el equipo fuera calibrado, utilizando el método de medición de 20.75 minutos anteriormente mencionado, bajo una secuencia donde primeramente se midió el

disolvente acetona (2 veces), posteriormente dos muestras con 3 repeticiones cada una, otras dos mediciones con acetona y así sucesivamente hasta finalizar con las mediciones de la acetona.

Se eligieron las abundancias de acuerdo a la biblioteca del equipo, corroborando con estándares conocidos.

### 7.5.1 Preparación de las disoluciones.

Se prepararon disoluciones madre de lambda cialotrina, permetrina cis y permetrina trans a una concentración calculada. El procedimiento de preparación para éstas fue el siguiente:

- Pesar un vial de 20 mL
- Pesar una cantidad calculada de plaguicida.
- Disolver con acetona.
- Pesar y tomar la lectura final.
- Agitar la disolución.

### 7.5.2 Preparación de la curva de calibración.

Las curvas de calibración con las que se hicieron las mediciones del lote candidato a material de referencia se prepararon en matriz, esto es, en el aguacate libre de plaguicidas. La medición de la fracción de masa de la lambda cialotrina, permetrina cis y permetrina trans se realizó por curva de calibración con estándar interno (deltametrina), usando la siguiente ecuación:

$$w_a = \left( \frac{rA_m - \beta_o}{\beta_1} \right) * w_{EI}$$

Donde:

$w_a$	Fracción de masa del plaguicida en la muestra.
$rA_m$	Relación de respuesta o área del analito de interés y el estándar interno ( $A_m/A_{EI}$ ).
$\beta_o$	Ordenada al origen.

$\beta_1$	Pendiente de la función de calibración.
wEI	Concentración (fracción de masa) del estándar interno.

La curva de calibración se preparó en matriz, usando aguacate liofilizado libre de plaguicidas, adicionado con la cantidad calculada de las disoluciones de los plaguicidas de interés. El procedimiento para cada nivel de la curva de calibración fue el siguiente:

- Pesarse un tubo de centrifuga de 50 mL limpio y seco.
- Pesarse 2 g de aguacate libre de plaguicidas y agregar la cantidad de disolución madre de lambda cialotrina, permetrina cis y permetrina trans de acuerdo al nivel de la curva.
- Agregar la disolución de EI.
- Hacer la extracción con el procedimiento ya descrito.
- Los extractos obtenidos se inyectan en el cromatógrafo.

### **7.6 Obtención de un candidato a material de referencia**

Se prepararon dos candidatos a materiales de referencia, uno libre de plaguicidas y otro con una mezcla de plaguicidas, en el que se expusieron a plaguicidas los árboles de aguacate para lograr tener la seguridad de que el fruto de aguacate contendría los plaguicidas de interés tales como: acefato, metamidofos, dimetoato, malation, metil paratión, lambda cialotrina, permetrina (cis y trans) y carbendazim. Para mantenerlos estables se eliminó el agua por el proceso de liofilización; para lograr su homogeneización el aguacate liofilizado se molió y tamizó a un tamaño de partícula de aproximadamente 300  $\mu\text{m}$ , se subdividió para lograr tenerlo homogéneo, se envasaron y empacaron al vacío.



## **VIII. RESULTADOS Y DISCUSION**

### **8.1 Exposición de plantas de aguacate a plaguicidas**

Para este trabajo utilizamos 17 árboles de aguacate expuestos a plaguicidas, además de los que se utilizaron para elaborar el control negativo/blanco. Los árboles se expusieron a los siguientes plaguicidas: acefato, metamidofos, paratión, lambda cialotrina, malatión, carbendazim, dimetoato y permectrina, simulando la práctica de los productores. Los frutos se cosecharon y se llevaron al CENAM para su procesamiento.

**Cuadro 11.-** Características de los plaguicidas utilizados para preparar las disoluciones para la dosificación.

Plaguicidas			Características del plaguicida		
Nombre técnico	Nombre comercial	Composición (% en peso)	Ingrediente activo, equivalente a	Presentación	Unidades requeridas
Acefato	Orthene ultra (Pellets)	97.0	970 g de I.A./kg	Bolsa de 1 kg en pellets	2
Permetrina	Ambush 34	33.66	500 g de I.A./kg	Botella de 1 L, concentrado emulsionable	2
Metamidofos	Mattafox 600 LM	50	600 g de I.A./L.	Botella de 1 L, líquido miscible	2
Lambda-cialotrina	Kendo 6.5 CE	6.50	70 g de I.A./L.	Botella de 1 L, concentrado emulsionable	2
Paratión metílico	Foliol	40.0	450 g de I.A./L	Botella de 1 L, microencapsulado	2
Dimetoato	Perfekthion	3.40	400 g de I.A./L.	Botella de 1 L, concentrado emulsionable	2
Malation,	Malation 1000	83.70	1 000 g de I.A./L.	Botella de 1 L, concentrado emulsionable	2
Carbendazim	Derosal	43.0	511 g de I.A./kg.	Botella de 1 L, suspensión acuosa	2

La identificación de los plaguicidas adicionados se mostró en los cuadros 8 y 9. En el siguiente cuadro se pueden observar la relación de los árboles expuestos a plaguicidas, el periodo en el que se aplicaron y el número de aplicaciones.

**Cuadro 12.-** Relación de árboles expuestos a plaguicidas semanalmente para tener una mezcla.

<b>Código</b>	<b>No. de árbol</b>	<b>Período</b>	<b>Aplicaciones</b>
1m	10	9/07/2013 al 2/11/2013	14
2m	6	9/07/2013 al 14/12/2013	13
3m	8	9/07/2013 al 7/12/2013	17
4m	12	9/07/2013 al 14/12/2013	19
5m	15	9/07/2013 al 14/12/2013	19
6m	4	25/06/2013 al 14/12/2013	20

## **8.2 Selección de los frutos expuestos para la determinación del nivel de exposición a plaguicidas, de acuerdo a los criterios de maduración.**

Se seleccionaron los frutos de acuerdo a su nivel de madurez, se eligieron aquellos que tuvieron una consistencia firme (ligeramente verdes) y un tamaño de aproximadamente 150 g, se colocaron en una rejilla de plástico, se identificó con el número del árbol y el plaguicida o la mezcla de plaguicidas que se aplicaron y se transportaron al CENAM para su procesamiento. Una vez en el CENAM, se esperó hasta lograr una madurez firme en los aguacates, no se lavaron para evitar eliminar los plaguicidas que se encontraban en la cáscara, se partieron en rodajas, se les quitó el hueso o la semilla y se trituraron en un procesador de alimentos.



**Figura 8.-** Selección de aguacates, corte y triturado de éstos.

### **8.3 Obtención de un lote homogéneo de las muestras de aguacate liofilizado.**

#### **8.3.1 Identificación de las mejores condiciones de liofilización, vacío, temperatura y tiempo.**

Se realizaron diferentes experimentos utilizando el fruto control negativo/blanco, con la finalidad de obtener las mejores condiciones de liofilización, éstas fueron las siguientes:

**Cuadro 13.-** Condiciones del programa de liofilización.

Etapa	Temperatura °C	Tiempo (min)	R/M	Vacío (mtorr)
Etapa de tratamiento térmico	-40	120	M	
Fases de congelación, condensación y vacío				
Congelación	-40			
Tiempo adicional (min)	5			
Condensador	-45			
Vacío (mtorr)	250			
Etapas del ciclo de secado				
1	-40	360	M	250
2	-20	420	M	200
3	20	1 200	R	100
4	20	420	M	100
Secado secundario				
Programación secundaria	30			
Programación del post calentamiento				
Temperatura (°C)	30	1 000		100

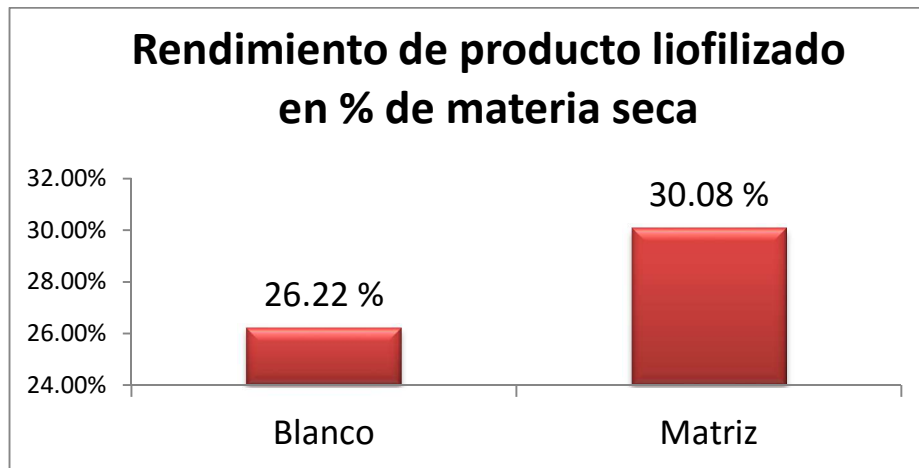
M= mantenido

R= rampa

Tiempo total del proceso

3820	Minutos
63.6	Horas

En la figura 9 se muestra el rendimiento del producto liofilizado en ambos materiales de referencia candidatos y en la figura 10 se aprecia el producto liofilizado.



**Figura 9.-** Eficiencia del proceso de liofilización en por ciento de materia seca.



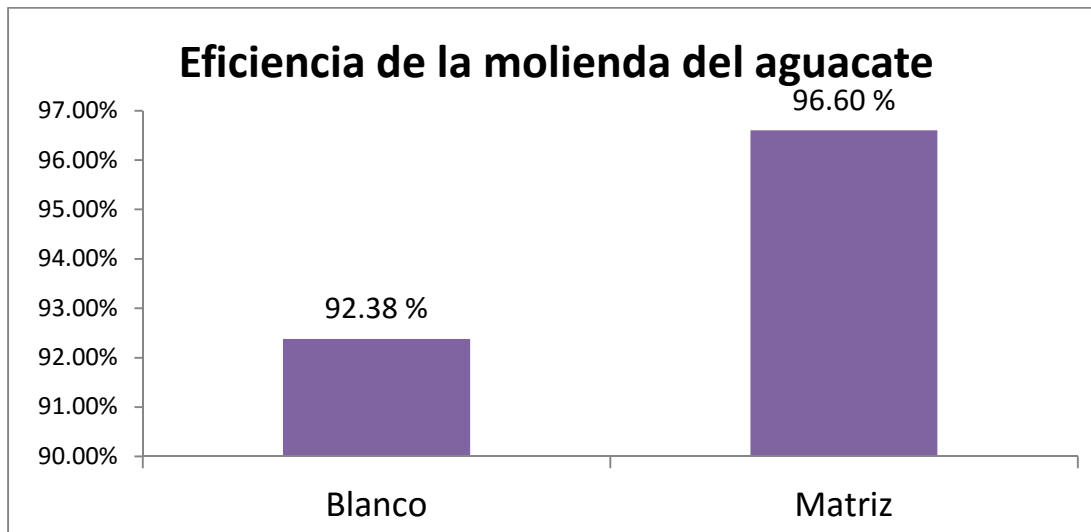
**Figura 10.-** Proceso de liofilización.

### **8.3.2 Identificación de las mejores condiciones de molienda del fruto aguacate.**

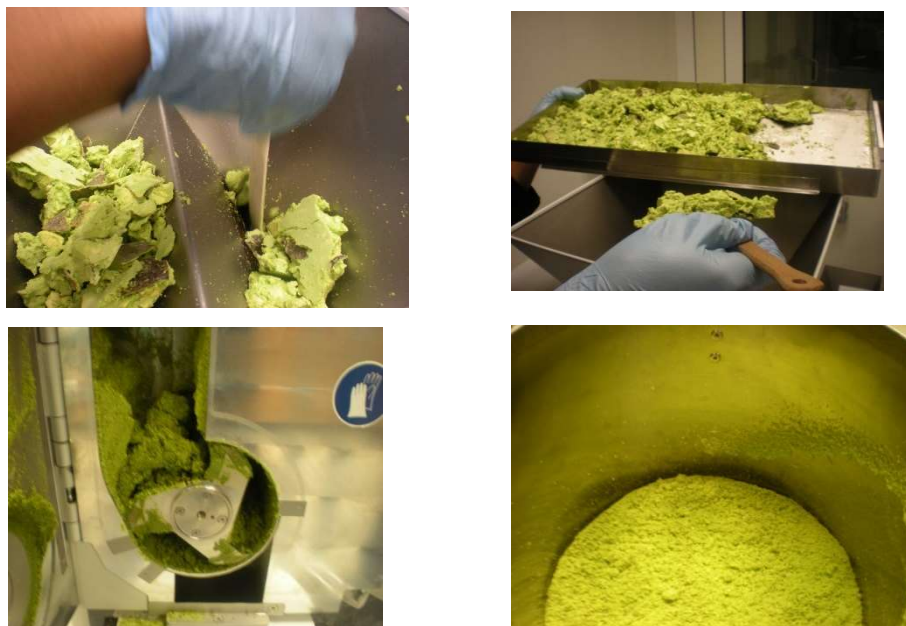
La malla con los cuales el producto no se aglomeró, fue la de 1 000  $\mu\text{m}$ , a 800 rpm. Bajo estas condiciones se obtuvo una consistencia adecuada del producto.

### **8.3.3 Molienda de frutos de aguacate con base a las mejores condiciones.**

Se obtuvo la eficiencia del molido, tomando en consideración la cantidad de muestra que se obtuvo después de la molienda entre la cantidad de muestra antes de molerse, por 100.



**Figura 11.-** Eficiencia del proceso de la molienda en porcentaje de materia seca.

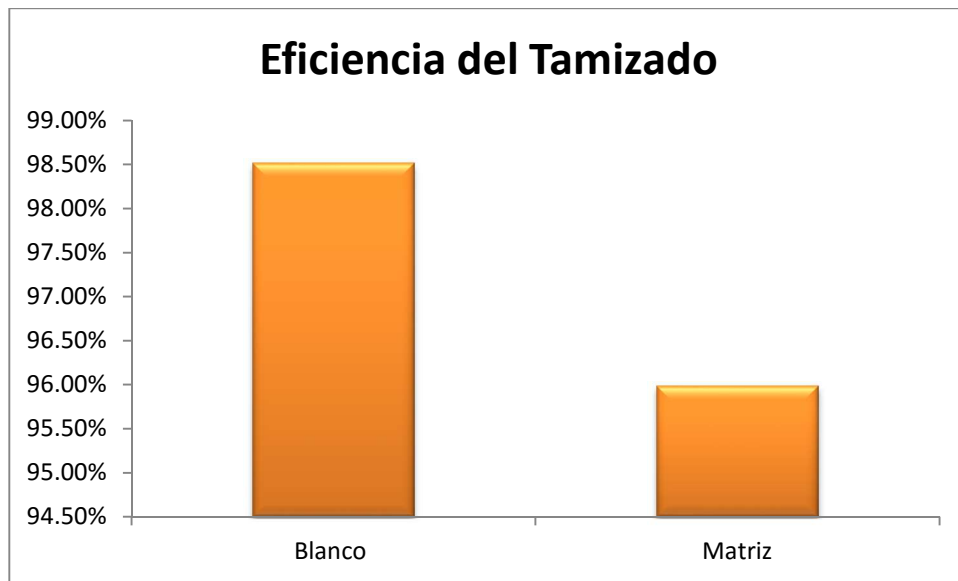


**Figura 12.-** Molienda del aguacate.

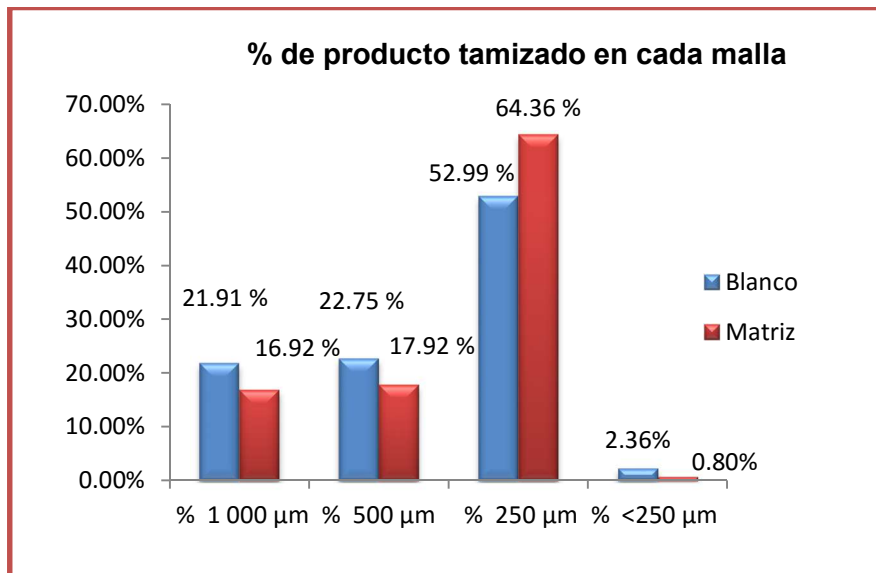
### 8.3.4 Determinación del nivel de tamizado de las muestras molidas de frutos de aguacate.

De acuerdo al producto tamizado se aprecia que en la malla de 1 000  $\mu\text{m}$  se retiene la cáscara del aguacate, la malla de 500  $\mu\text{m}$  retiene una mezcla de cáscara y aguacate, la malla de 250  $\mu\text{m}$  el aguacate es más fino (el más aceptable) y < 250

µm logró pasar poca muestra, pero es mucho más fina. El tamaño de partícula ideal oscila entre un tamaño de partícula de 250 µm.



**Figura 13.-** Eficiencia del proceso de tamizado en porcentaje de materia seca.



**Figura 14.-** Eficiencia del proceso de tamizado de los dos MR, blanco y matriz, en cada malla.

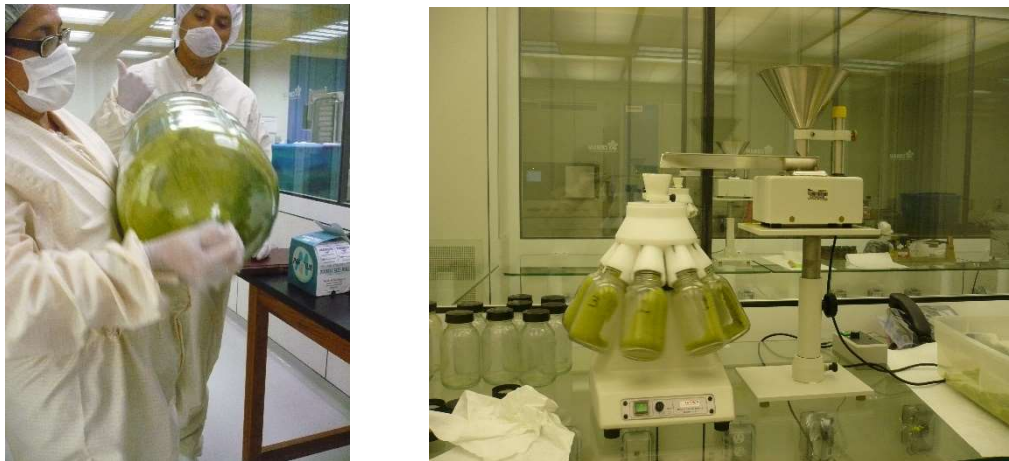




**Figura 15.-** Mallas de diferentes tamaños para el tamizado.

### 8.3.5 Homogenización de las muestras de fruto de aguacates, molido y tamizado.

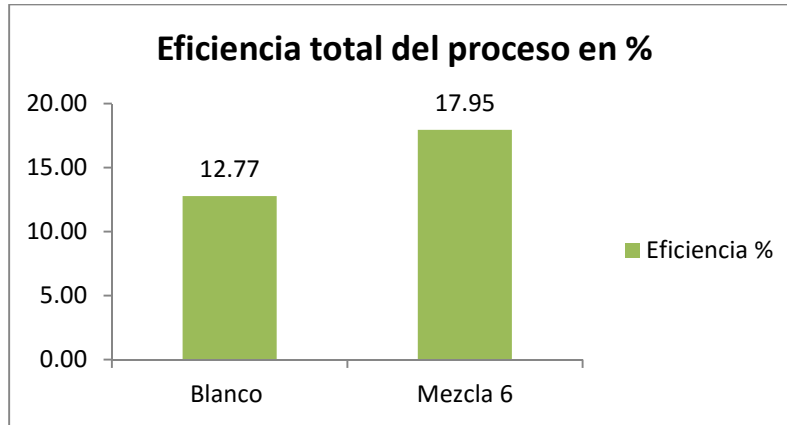
El proceso de subdivisión se realizó usando el equipo Riffler que se muestra en la figura 16.



**Figura 16.-** Subdivisión u homogenización del aguacate.

### 8.3.6 Obtención de un lote homogéneo de fruto de aguacate.

La eficiencia total del proceso de preparación de los materiales de referencia se muestra en la figura 17.



**Figura 17.-** Eficiencia total del proceso de preparación de los materiales de referencia.

#### 8.3.6.1 Envasado del material de referencia

En la figura 18 se muestra el envasado del producto, el total de frascos envasados de los 2 materiales de referencia fueron los siguientes: 150 frascos del blanco, 263 frascos de la mezcla de plaguicidas.



**Figura 18.-** Envasado, sellado y etiquetado del producto.

### 8.3.6.2 Empacado del lote

Se empacaron al vacío y se colocó la etiqueta afuera del frasco para su fácil identificación.



Figura 19.- Empacado al vacío.

### 8.3.6.3 Medición de la humedad

El % de humedad promedio en función del tiempo de los materiales de referencia DMR-516a Plaguicidas en aguacate y DMR-523a Aguacate libre de plaguicidas, se puede apreciar en la figura 20.

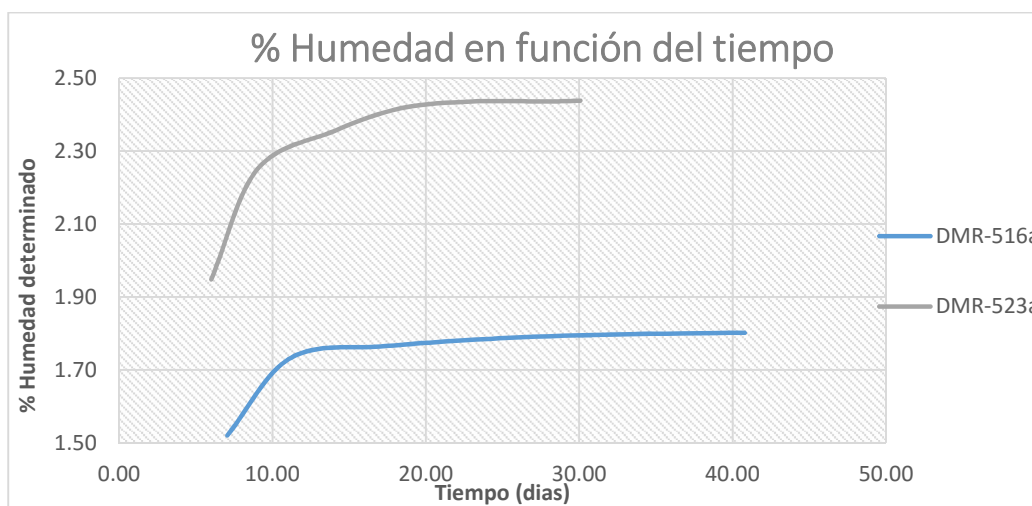


Figura 20.- % de humedad de los materiales de referencia DMR-516a y DMR-523a.

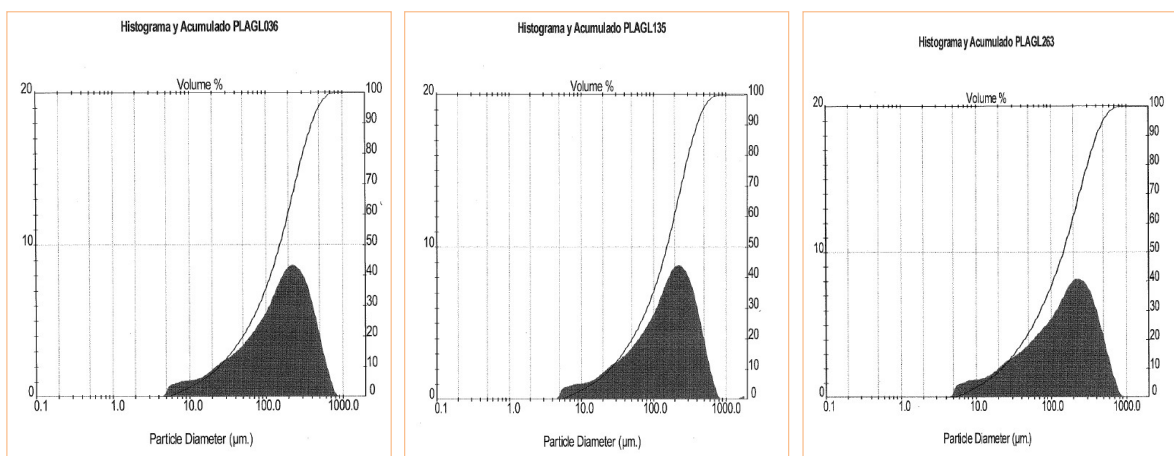
**Cuadro 14.-** Datos del % de humedad de los MR DMR-516a y DMR-523a.

MR DMR-516a		MR DMR-523a	
Tiempo de medición promedio (días)	% Humedad promedio	Tiempo de medición promedio (días)	% Humedad promedio
7.06	1.5201	6.01	1.95
11.22	1.7336	9.02	2.25
17.43	1.7653	14.04	2.36
25.26	1.7874	18.39	2.42
32.75	1.7971	23.09	2.44
40.79	1.8019	28.02	2.44
40.79	1.80	30.08	2.44

### 8.3.6.4 Medición de la distribución del tamaño de partícula

#### 8.3.6.4.1 DMR-516a Plaguicidas en aguacate liofilizado.

En las tres gráficas siguientes se observa la distribución del tamaño de las partículas en las 3 muestras analizadas y la distribución del tamaño de partícula del material de referencia candidato de plaguicidas.



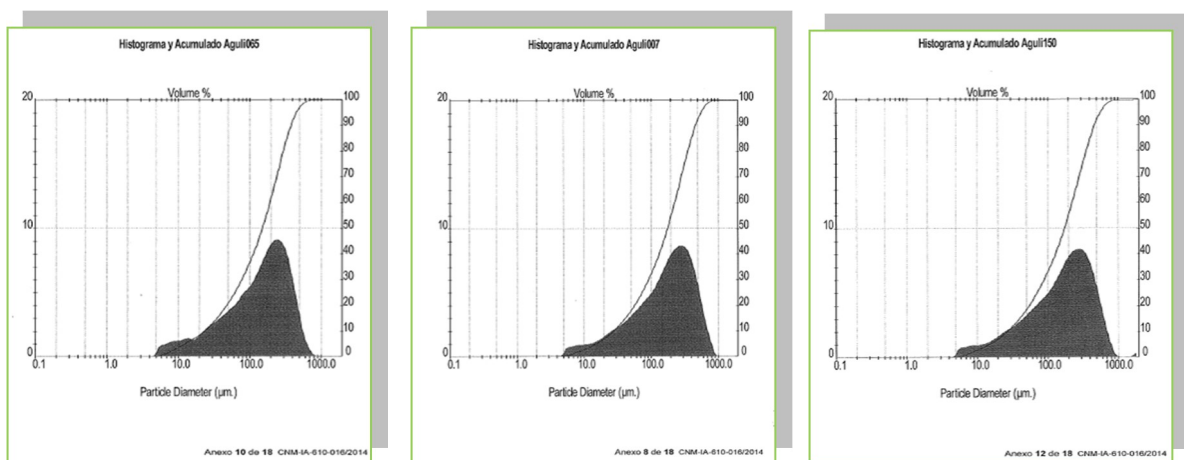
**Figura 21.-** Distribución del tamaño de partícula del DRM-516a Plaguicidas en aguacate liofilizado.

**Cuadro 15.-** Distribución del tamaño de partícula del DRM-516a Plaguicidas en aguacate liofilizado.

No de botella	Moda [ $\mu\text{m}$ ]	d(v, 0.1) [ $\mu\text{m}$ ]	d(v, 0.5) [ $\mu\text{m}$ ]	d(v, 0.9) [ $\mu\text{m}$ ]
DMR 516a/036	224.79	24.39	153.72	405.53
DMR 516a/135	222.73	24.77	153.95	401.46
DMR 516a/263	227.21	21.82	145.74	408.55

### 8.3.6.4.2 DMR-523a Aguacate libre de plaguicidas.

En las tres gráficas siguientes se observa la distribución del tamaño de las partículas en las tres 3 muestras analizadas y la distribución del tamaño de partícula del material de referencia candidato libre de plaguicidas.



**Figura 22.-** Distribución del tamaño de partícula del DRM-523a Aguacate libre de plaguicidas.

**Cuadro 16.-** Distribución del tamaño de partícula del DRM-523a Aguacate libre de plaguicidas.

No de botella	Moda [ $\mu\text{m}$ ]	d(v, 0.1) [ $\mu\text{m}$ ]	d(v, 0.5) [ $\mu\text{m}$ ]	d(v, 0.9) [ $\mu\text{m}$ ]
DMR 523a/007	286.26	27.48	176.90	462.06
DMR 523a/065	244.00	23.45	151.09	379.75
DMR 523a/150	279.59	26.56	173.22	467.34

### 8.3.6.5 Medición de la densidad

La densidad del material de referencia DMR-523a fue de  $330 \text{ kg/m}^3$ , ésta fue obtenida midiendo la masa y el volumen del aguacate que no contenía plaguicidas, en la Dirección de Metrología Mecánica del CENAM.

### 8.4 Desarrollo de una metodología para la extracción de los plaguicidas en aguacate.

Se realizaron diferentes experimentos utilizando distintos disolventes durante las etapas de extracción, con el propósito de encontrar con cuál disolvente se extraen en mayor porcentaje los plaguicidas de interés. Como se puede apreciar en el cuadro 17 usando acetonitrilo en la primera extracción, acetona en la 2<sup>a</sup>. extracción y acetona en la 3<sup>a</sup>. extracción se obtienen las recuperaciones más altas de los 3 plaguicidas de interés. También se realizaron los análisis usando el blanco fortificado (cuadro 18) y la muestra (cuadro 19).

**Cuadro 17.-.** Disolventes usados en el proceso de extracción para validar la recuperación.

Procedimiento de extracción Quechers modificado (Narong, 2013)				
Ensayo/Extracción	Primer ensayo	Segundo ensayo	Tercer ensayo	Cuarto ensayo
Primera	Acetonitrilo + ácido acético 1 %	Acetonitrilo + (ácido acético 1 %):Agua (1:1)	Acetonitrilo, lavado con 2 mL la fase inorgánica	Acetonitrilo
Segunda	Acetonitrilo	Acetonitrilo	Acetonitrilo	Hexano: Acetona (1:1)
Tercera	Acetonitrilo	Etanol	Etanol	Acetona

Procedimiento de extracción Quechers modificado (Narong, 2013)			
Ensayo/Extracción	Quinto ensayo	Sexto ensayo	Séptimo ensayo
Primera	Acetonitrilo	Acetonitrilo	Acetonitrilo
Segunda	Hexano: Acetona (1:4)	Acetona	Acetona
Tercera	Acetona	Acetona	Acetona

**Cuadro 18.-** % de recuperación de las extracciones en el blanco fortificado.

Experimento	Primero			Segundo			Tercero			Cuarto		
	1 <sup>a</sup> .	2 <sup>a</sup> .	3 <sup>a</sup> .	1 <sup>a</sup> .	2 <sup>a</sup> .	3 <sup>a</sup> .	1 <sup>a</sup> .	2 <sup>a</sup> .	3 <sup>a</sup> .	1 <sup>a</sup> .	2 <sup>a</sup> .	3 <sup>a</sup> .
Extracción/plaguicida												
Lambda cialotrina	26.5	41.7	30.8	15.1	64.7	20.2	57.4	17.0	25.5	88.8	5.5	5.6
Permetrina Cis	26.3	42.9	30.8	1.3	46.8	52.0	9.0	74.4	16.6	25.4	37.7	37.0
Permetrina Trans	0	0	0	15.7	32.6	51.6	40.3	26.4	33.3	65.8	0.0	34.2

Experimento	Quinto			Sexto			Séptimo		
	1 <sup>a</sup> .	2 <sup>a</sup> .	3 <sup>a</sup> .	1 <sup>a</sup> .	2 <sup>a</sup> .	3 <sup>a</sup> .	1 <sup>a</sup> .	2 <sup>a</sup> .	3 <sup>a</sup> .
Extracción/plaguicida									
Lambda cialotrina	81.4	16.9	1.7	3.8	92.9	3.3	0.1	99.9	0
Permetrina Cis	23.3	76.7	0.0	24.8	73.8	1.5	62.2	37.8	0
Permetrina Trans	76.4	23.6	0.0	100	0	0	100	0	0



**Cuadro 19.-** % de recuperación de las extracciones en el material de referencia de plaguicidas.

Experimento	Primero			Segundo			Tercero			Cuarto		
	1 <sup>a</sup> .	2 <sup>a</sup> .	3 <sup>a</sup> .	1 <sup>a</sup> .	2 <sup>a</sup> .	3 <sup>a</sup> .	1 <sup>a</sup> .	2 <sup>a</sup> .	3 <sup>a</sup> .	1 <sup>a</sup> .	2 <sup>a</sup> .	3 <sup>a</sup> .
Extracción/plaguicida												
Lambda cialotrina	28.5	32	36.6	60.6	25.5	13.9	0	67.4	32.6	91.0	0.77	8.2
Permetrina Cis	28.7	32.5	38.8	51.3	18.0	29.6	0	56.6	43.4	46.6	0.0	53.4
Permetrina Trans	0	100	0	75	0	25.0	0	73.9	26.0	0.0	42.2	57.8

Experimento	Quinto			Sexto			Séptimo		
	1 <sup>a</sup> .	2 <sup>a</sup> .	3 <sup>a</sup> .	1 <sup>a</sup> .	2 <sup>a</sup> .	3 <sup>a</sup> .	1 <sup>a</sup> .	2 <sup>a</sup> .	3 <sup>a</sup> .
Extracción/plaguicida									
Lambda cialotrina	20.0	20.0	60.0	79.5	20.5	0	69.1	30.9	0
Permetrina Cis	26.7	26.7	46.6	100	0	0	88.3	11.7	0
Permetrina Trans	50	50	0	0	100	0	19.4	80.6	0

## 8.5 Desarrollo de la metodología para medir la fracción de masa de los plaguicidas en el candidato a material de referencia

Se obtuvieron tres pares de iones de cada uno de los plaguicidas y se eligió el par de iones con el cual se cuantificó, éstos fueron los que están marcados en color oscuro.

**Cuadro 20.-** Pares de iones de los plaguicidas objetivo.

Plaguicidas	Tiempo de retención	Q <sub>0</sub>	Q <sub>1</sub>	Q <sub>2</sub>
Deltametrina	17.93	181-152.1	250.7-172	252.9-93
L- cialotrina	14.77	208-181	197-141	181.1-152
Permetrina I (Cis)	15.48	183.1-168.1	183.1-165.1	183.1-153.1
Permetrina II (Trans)	15.60	182.9-155.1	182.9-168.1	162.9-91.1

Los plaguicidas objetivo fueron analizados usando el GC-MS-MS triple cuadrupolo, como se aprecia en el método.

### 8.5.1 Preparación de las disoluciones.

#### 8.5.1.1 Disoluciones madre de plaguicidas.

Se prepararon las siguientes disoluciones a partir de las cuales se fortificaron las muestras de aguacate.

Lambda cialotrina.- se pesaron 0.200 mg de una pureza del 99.5 % en 15.8 g de acetona, esta solución quedó a 12.78 mg/kg.

Permetrina cis.- se pesaron 0.336 mg de una pureza del 99.5 % en 15.67 g de acetona, esta solución quedó a 21.32 mg/kg.

Permetrina trans.- se pesaron 0.227 mg de una pureza del 99 % en 15.67 g de acetona, esta solución quedó a 12.78 mg/kg.

Estándar interno Deltametrina.- se pesaron 0.160 mg de una pureza del 99.7 % en 15.91 g de acetona, esta solución quedó a 10.14 mg/kg.

#### **8.5.1.2 Curva de calibración.**

Se utilizaron 2 g del MR libre de plaguicidas adicionado con los siguientes compuestos:

Nivel 1.- se tomaron 0.0035 mg de la disolución de 12.78 mg/kg de lambda cialotrina, 0.010 mg de la disolución de 21.32 mg/kg de permetrina cis, 0.015 mg de la disolución de 12.78 mg/kg de permetrina trans y se colocaron en 2 g de la muestra.

Se le adicionó además 0.2124 mg de la disolución de 10.14 mg/kg del estándar interno (EI) de deltametrina. Esta disolución quedó de 0.023 mg/kg de lambda cialotrina, 0.111 de permetrina cis, 0.110 de permetrina trans y 1.068 mg/kg del EI.

Nivel 2.- se tomaron 0.0046 mg de la disolución de 12.78 mg/kg de lambda cialotrina, 0.014 mg de la disolución de 21.32 mg/kg de permetrina cis, 0.033 mg de la disolución de 12.78 mg/kg de permetrina trans y se colocaron en 2 g de la muestra.

Se le adicionó además 0.2169 mg de la disolución de 10.14 mg/kg del estándar interno (EI) de deltametrina. Esta disolución quedó de 0.03 mg/kg de lambda cialotrina, 0.15 de permetrina cis, 0.24 de permetrina trans y 1.10 mg/kg del EI.

Nivel 3.- se tomaron 0.006 mg de la disolución de 12.78 mg/kg de lambda cialotrina, 0.020 mg de la disolución de 21.32 mg/kg de permetrina cis 0.041 mg de la disolución de 12.78 mg/kg de permetrina trans y se colocaron en 2 g de la muestra.

Se le adicionó además 0.2152 g de la disolución de 10.14 mg/kg del estándar interno (EI) de deltametrina. Esta disolución quedó de 0.04 mg/kg de lambda cialotrina, 0.21 de permetrina cis, 0.30 de permetrina trans y 1.09 mg/kg del EI.

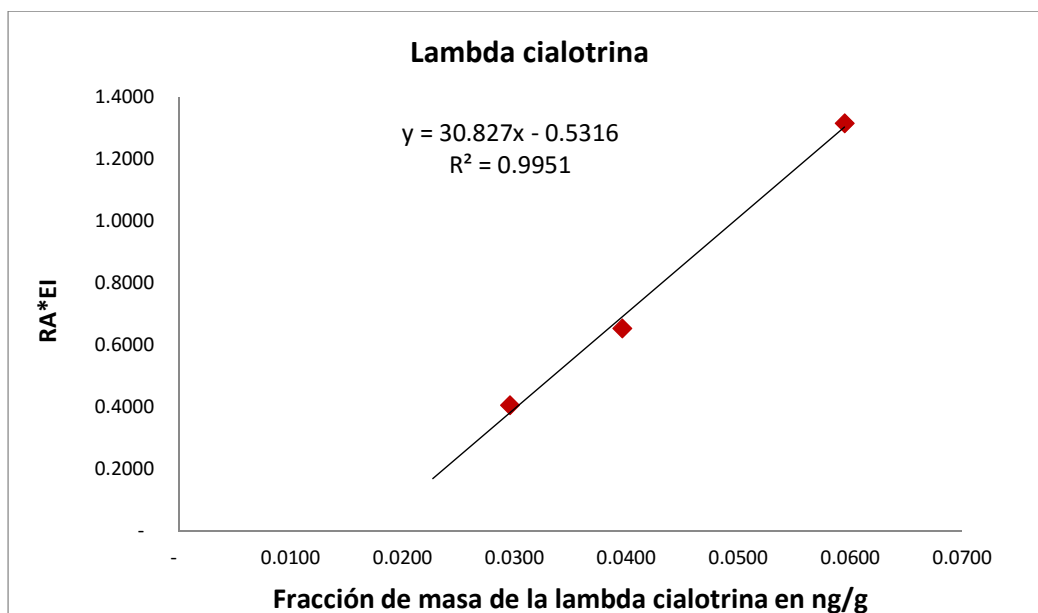
Nivel 4.- se tomaron 0.0079 mg de la disolución de 12.78 mg/kg de lambda cialotrina, 0.024 mg de la disolución de 21.32 mg/kg de permetrina cis, 0.057 mg de la disolución de 12.78 mg/kg de permetrina trans y se colocaron en 2 g de la muestra.

Se le adicionó además 0.2153 g de la disolución de 10.14 mg/kg del estándar interno (EI) de deltametrina. Esta disolución quedó de 0.05 mg/kg de lambda cialotrina, 0.26 de permetrina cis, 0.410 de permetrina trans y 1.09 mg/kg del EI.

Nivel 5.- se tomaron 0.009 mg de la disolución de 12.78 mg/kg de lambda cialotrina, 0.033 mg de la disolución de 21.32 mg/kg de permetrina cis, 0.072 mg de la disolución de 12.78 mg/kg de permetrina trans y se colocaron en 2 g de la muestra. Se le adicionó además 0.2143 g de la disolución de 10.14 mg/kg del estándar interno (EI) de deltametrina. Esta disolución quedó de 0.06 mg/kg de lambda cialotrina, 0.36 de permetrina cis, 0.52 de permetrina trans y 1.09 mg/kg del EI.

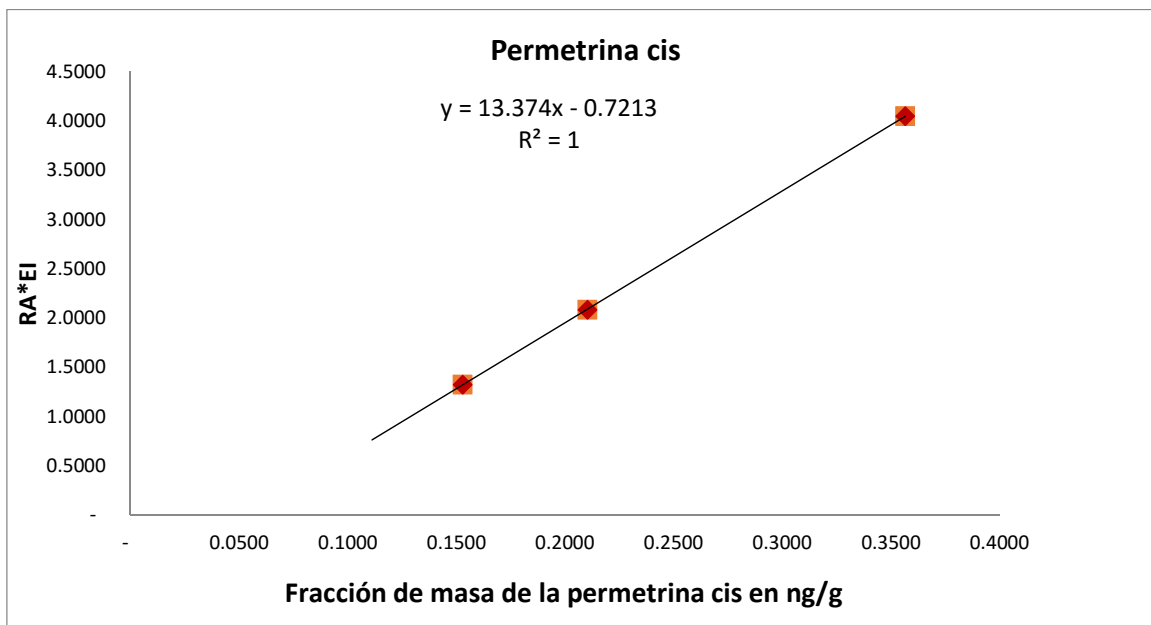
Las curvas obtenidas se muestran a continuación:

Para lambda cialotrina se obtuvo la siguiente curva.



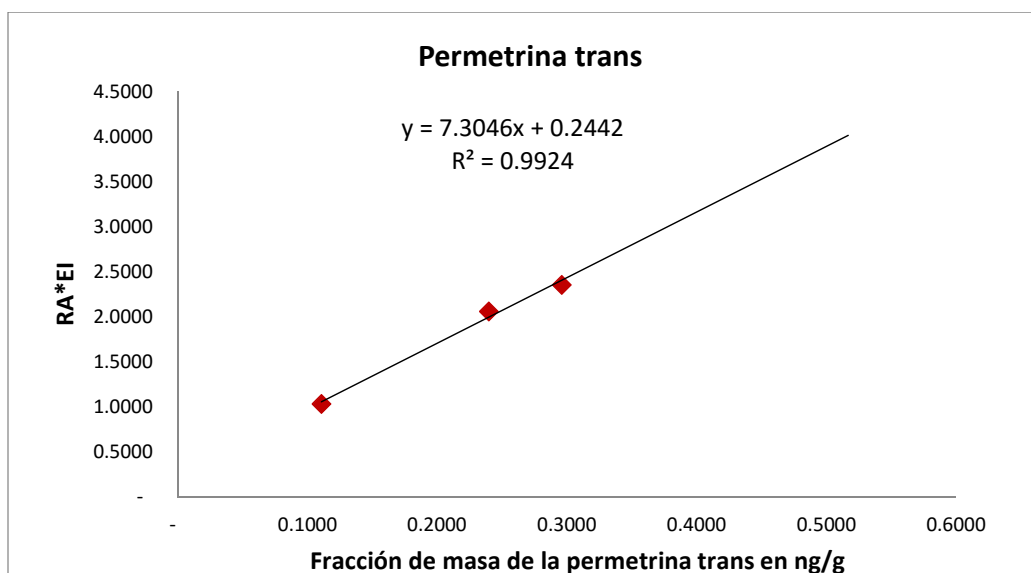
**Figura 23.-** Gráfico de la curva de calibración de lambda cialotrina.

Para la cuantificación de permetrina cis se realizó la siguiente curva:



**Figura 24.-** Gráfico de la curva de calibración de la permetrina cis.

Para la cuantificación de permetrina trans se realizó la siguiente curva:



**Figura 25.-** Gráfico de la curva de calibración de permetrina trans.

### 8.5.2 Resultados de la fracción de masa de los mensurandos en las muestras.

Los resultados de la fracción de masa de los mensurandos en el material de referencia candidato de plaguicidas se encuentran en los cuadros 21, 22 y 23.

**Cuadro 21.-** Fracción de masa de lambda cialotrina en las muestras (ng/g).

Muestra	Fracción de masa de lambda cialotrina en ng/g					
	Submuestras			Promedio	Desv. Est.	CV %
	1	2	3			
026	53.1985	61.6456	85.5895	66.8112	16.8020	25.15
200	54.1330	71.2580	62.2264	62.5392	8.5668	13.70
251	61.3203	68.6648	64.6115	64.8656	3.6788	5.67
<b>Promedio</b>	56.2173	67.1895	70.8091	64.7386	7.5984	11.74

**Cuadro 22.-** Fracción de masa de permetrina cis en las muestras (ng/g).

Muestra	Fracción de masa de la permetrina cis en ng/g					
	Submuestras			Promedio	Desv. Est.	CV %
	1	2	3			
026	183.6002	218.5770	252.8319	218.3363	34.6165	15.85
200	198.5352	262.8774	212.3706	224.5944	33.8680	15.08
251	233.4663	239.0144	232.3889	234.9565	3.5553	1.51
<b>Promedio</b>	205.2006	240.1562	232.5305	225.9624	18.3801	8.13

**Cuadro 23.-** Fracción de masa de permetrina trans en las muestras (ng/g).

Muestra	Fracción de masa de permetrina trans en ng/g					
	Submuestras			Promedio	Desv. Est.	CV %
	1	2	3			
026	334.9396	429.5025	514.2416	426.2279	89.6958	21.04
200	339.7729	534.4103	436.6247	436.9360	97.3191	22.27
251	499.7972	510.5476	466.5037	492.2828	22.9633	4.66
<b>Promedio</b>	391.5032	491.4868	472.4567	451.8156	53.0916	11.75

Análisis de varianza de un factor  
de la lambda cialotrina

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	3	200.433617	66.8112057	282.305578
Fila 2	3	187.617471	62.539157	73.3896996
Fila 3	3	194.59667	64.8655568	13.5337145

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	27.4480864	2	13.7240432	0.11150839	0.89629472	5.14325285
Dentro de los grupos	738.457984	6	123.076331			
Total	765.906071	8				

Análisis de varianza de un factor  
de la permetrina cis

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	3	655.00903	218.336343	1198.30286
Fila 2	3	673.783259	224.59442	1147.04403
Fila 3	3	704.869573	234.956524	12.639854

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	422.767151	2	211.383575	0.26893736	0.77293677	5.14325285
Dentro de los grupos	4715.97349	6	785.995582			
Total	5138.74064	8				

## Análisis de varianza de un factor para la permetrina trans

### RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	3	1278.68367	426.227891	8045.34386
Fila 2	3	1310.80795	436.935982	9470.99823
Fila 3	3	1476.84853	492.282843	527.314867

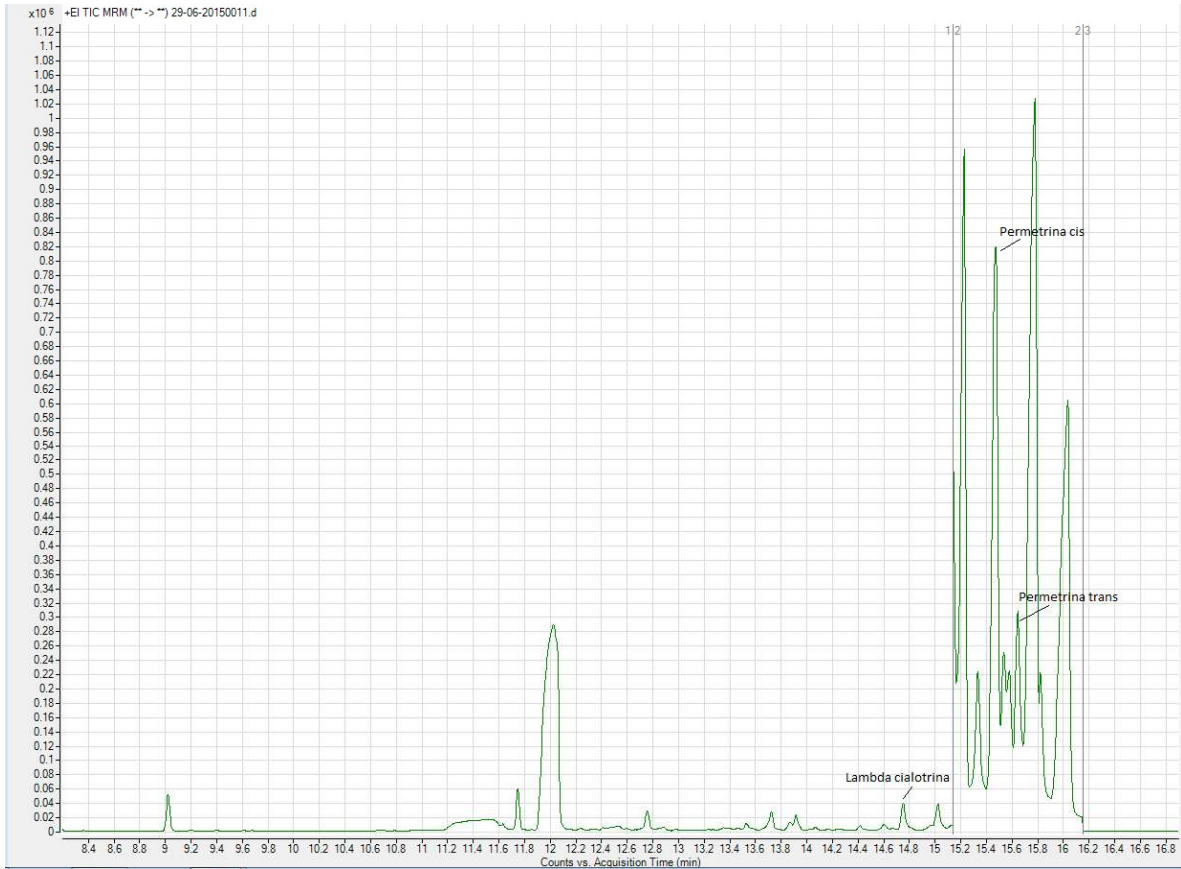
### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	7541.19482	2	3770.59741	0.6269124	0.56591677	5.14325285
Dentro de los grupos	36087.3139	6	6014.55232			
Total	43628.5087	8				

Observando los resultados del análisis de varianza de un factor, no hubo diferencia significativa entre los grupos, ( $F$  calculada  $<$   $F$  crítica), en ninguno de los plaguicidas, por lo tanto el lote es homogéneo.

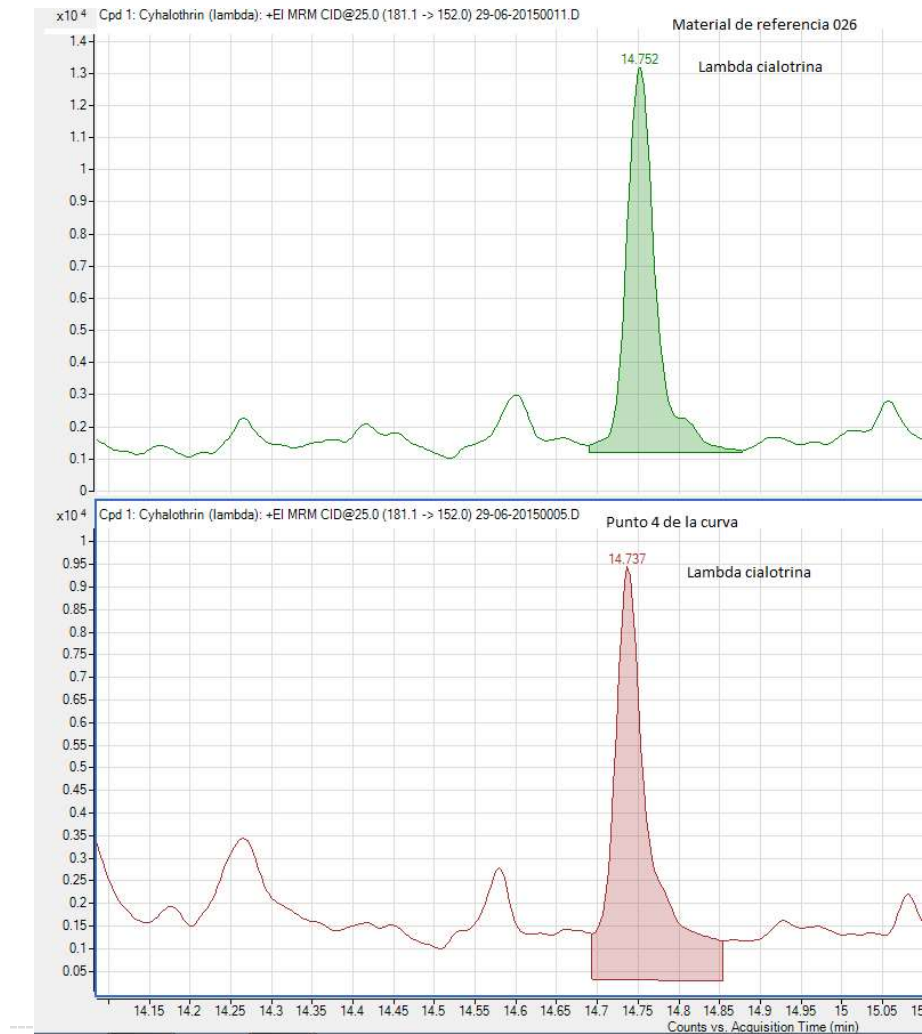


Como se puede apreciar en la figura 26, se ve un cromatograma del material de referencia de plaguicidas.



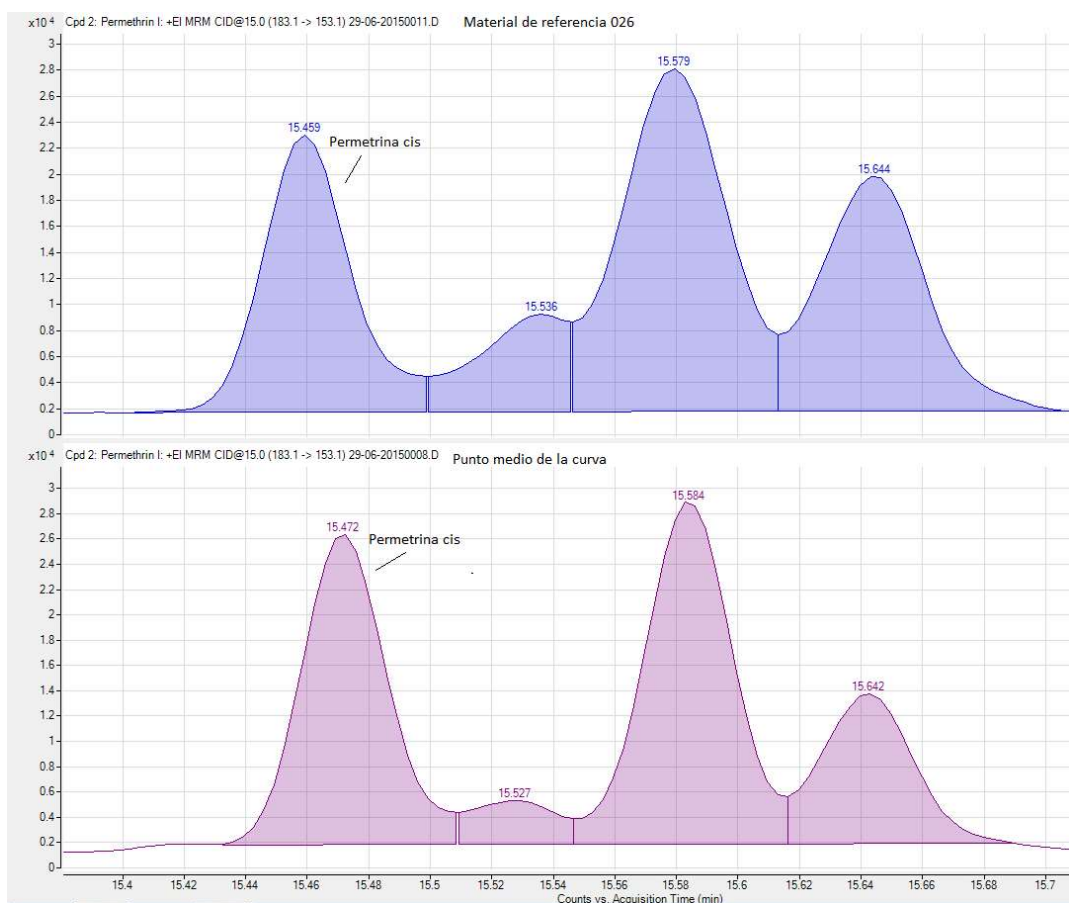
**Figura 26.-** Cromatograma del MR de plaguicidas en la matriz de aguacate.

En la siguiente figura se aprecian los cromatogramas donde se encuentra el pico de la lambda cialotrina, el de la parte de arriba corresponde al material de referencia 026 y el cromatograma de abajo es de la curva de calibración del punto 3 o punto medio.

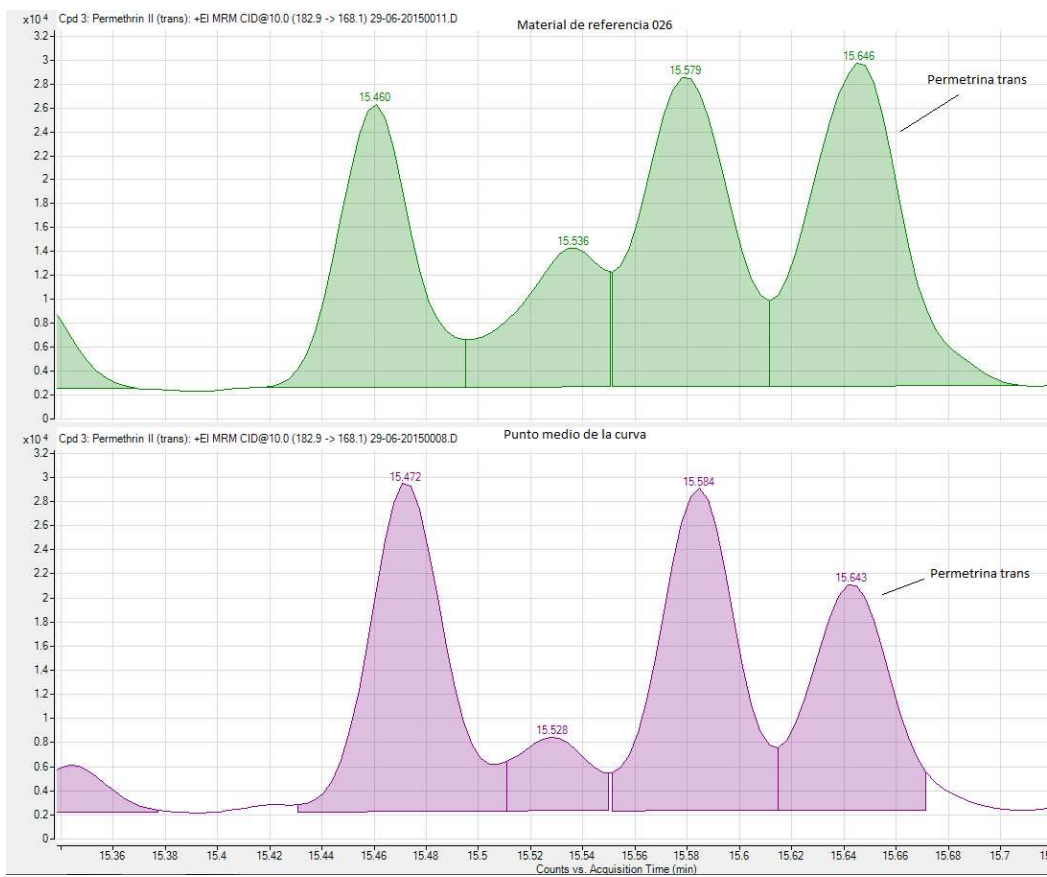


**Figura 27.-** Cromatograma de la lambda cialotrina.

En las siguientes figuras se pueden apreciar los cromatogramas de la permetrina, ambas permetrinas cis y trans contienen los dos picos. El primer pico corresponde a la permetrina cis y el segundo a la trans en cada uno de los cromatogramas.



**Figura 28.-** Cromatograma de la permetrina cis.



**Figura 29.-** Cromatograma de la permetrina trans.

## 8.6. DISCUSION

(Yuanxun, 1998) lograron producir un candidato a material de referencia usando el método de secado de liofilización con un tamaño de partícula de 22  $\mu\text{m}$ , lo cual es muy conveniente, ellos lo hicieron en hígado de res y utilizando un molino muy efectivo. Se notó que a un tamaño de partícula menor la consistencia del aguacate no fue la más adecuada, era muy pastosa. El tamaño de partícula logrado para los materiales de referencia candidatos fue menor a 300  $\mu\text{m}$ .

Se prepararon dos candidatos a materiales de referencia a partir de frutos de aguacate que fueron expuestos a plaguicidas (material de referencia de plaguicidas) y otro libre de plaguicidas (blanco). En este trabajo se presentaron las etapas realizadas para preparar el candidato a material de referencia de plaguicidas en aguacate y se desarrolló la metodología de extracción y de medición de los mismos. Al final del proceso de elaboración se obtuvieron dos materiales liofilizados con tamaño de partícula menor a 300  $\mu\text{m}$ . Debido a que este tipo de matriz contiene un alto contenido de grasa, esto no permitió obtener un material de referencia de un tamaño de partícula menor a 150  $\mu\text{m}$ .

El rendimiento total del procesamiento del candidato a material de referencia de plaguicidas obtenido fue del 17.8 % y del MR libre de plaguicidas o blanco del 12.8 %, lo cual se considera apropiado para este tipo de matrices, considerando que el aguacate contiene aproximadamente 74 % de agua y 15 % de grasa. El porcentaje de materia seca obtenido en el material de referencia libre de plaguicidas (blanco) fue del 26 % y del material de referencia de plaguicidas del 30 %.

Se logró implementar la metodología para extraer los plaguicidas siguientes: lambda cialotrina, permetrina cis y trans, usando el método QuEChERS modificado y los disolventes de extracción siguientes: el acetonitrilo en la primera extracción, la acetona en la 2a. extracción y acetona en la 3a. extracción, con ello se obtuvieron las más altas recuperaciones. El método de medición se realizó utilizando el cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas de triple cuadrupolo utilizando curva de calibración con estándar interno de deltametrina bajo las siguientes condiciones: Para el cromatógrafo de gases se trabajó con dos columnas de 15 m

x 250  $\mu\text{m}$  x 0.25  $\mu\text{m}$ , de 0 °C a 350 °C, columna 1: flujo: 0.907 mL/min, presión: 8.3119 psi; columna 2: flujo: 1.107 mL/min, presión: 2.3617 psi, temperatura del inyector de 280 °C y un programa en el horno de 60 °C, 1 min, 40 °C/min, 170 °C, 0 min, 10 °C/min, 310 °C, 3 min, con un tiempo de la corrida de 20.75 min y una post-corrida de 5.0 min a 310 °C, el volumen de inyección fue de 1  $\mu\text{L}$ .

El EM fue operado en ionización de impacto electrónico, con una energía de ionización de 70 eV, a una temperatura en la fuente de iones de 230 °C, temperatura del cuadrupolo de 150 °C, temperatura de la línea de transferencia de 230 °C, retardo del solvente de 4.0 min, gas He para enfriar con flujo de 2.25 mL/min, N<sub>2</sub> como gas en la celda de colisión a un flujo de 1.5 mL/min, con un barrido total de 50 m/z a 350 m/z y un modo de adquisición de monitoreo de reacción múltiple (MRM). El contenido promedio de lambda cialotrina del material de plaguicidas fue de 64.74 ng/g con una desviación estándar de 7.6 ng/g y un coeficiente de variación del 11.74 %, para la permetrina cis fue de 225.96 ng/g, una desviación estándar de 18.38 ng/g y un coeficiente de variación de 8.13 % y para la permetrina trans fue de 451.82 ng/g, una desviación estándar de 53.09 ng/g y un coeficiente de variación de 11.75 %.

## **IX. CONCLUSIONES**

Una de las etapas más complejas de la producción de un candidato a material de referencia de acuerdo a la normativa internacional es la preparación, que implica desde la selección de la materia prima hasta la conservación para su uso definitivo. El material de referencia preparado se hizo exponiendo los árboles de aguacate a plaguicidas, esto fue adecuado ya que el candidato a material de referencia contuvo los plaguicidas objetivo lambda cialotrina, permetrina cis y trans, es homogéneo y se ha mantenido estable por alrededor de dos años.

Se desarrollaron las metodologías de extracción y de medición con las cuales se podrán medir los plaguicidas de una manera eficiente y con un alto grado de recuperación que permitirán el análisis en niveles bajos de plaguicidas exigidos por

la legislación y lo más importante poder detectar contenidos de plaguicidas confiables para apoyar en la inocuidad alimentaria.

Las concentraciones de lambda cialotrina, permetrina cis y trans que contienen los materiales de referencia candidatos son adecuadas para el propósito de uso, ya que los niveles de dichos plaguicidas son comparables a las normativas internacionales, por debajo de los límites máximos que dictan las normas de USA, México, Canadá y Japón, no así la de la Unión Europea.

Los dos candidatos a materiales de referencia, uno libre de plaguicidas (control negativo o blanco) y otro material de referencia de plaguicidas, servirán como materiales de referencia de control, una vez que sean certificados, con los cuales los laboratorios analíticos podrán compararse y proporcionar resultados confiables.

## **X. PERSPECTIVAS**

De acuerdo a la metodología de extracción y de medición desarrolladas, se realizarán las pruebas de estabilidad y continuar validando los métodos, así como certificar los dos materiales de referencia.

Estos serán certificados por primera vez en México y mundialmente, ya que no existen MR en la matriz de aguacate que se hayan certificado en plaguicidas.

## XI.REFERENCIAS

- (s.f.). Obtenido de [http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database-redirect/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database-redirect/index_en.htm)
- Annastasiades, M. L. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce. 412-431. J-AOAC.
- AOAC. (2012). *Official Methods of Analysis of AOAC international 19th ed.* Arlington, VA: AOAC Internatinal.
- APEAM. (2013). *Asociación de productores y empaques exportadores de aguacate de Michoacán*. Obtenido de <http://www.apeamac.com/apeamac.html>
- Autoridad reguladora Environmental Protection Agency's (EPA's). (2013). Tolerances and exemptions for pesticide chemical residues in food.
- Badui Dergal, S. (2006). *Química de los alimentos* (4a ed.). Pearson.
- Calderón, G. (2009). *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua*. FAO. doi:ISBN 978-92-5-306153-2
- Campo mexicano*. (22 de Septiembre de 2015). Obtenido de Campo mexicano: <http://www.campomexicano.gob.mx/boletinsiap/18-e-tabla.html>
- Canada, H. (s.f.). Obtenido de <http://pr-rp.hc-sc.gc.ca/mrl-lrm/index-eng.php>
- CENAM. (2011). *Manual de diseño de laboratorios analíticos*. Querétaro, México.
- COFEPRIS. (16 de 04 de 2015). *Catalogo de plaguicidas*. Obtenido de <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx>
- Columé, A. C. (2001). Multiresidue screening of pesticides in fruits using an automatic solid-phase extraction system. . *Journal of agricultural and food chemistry*, 1109-1116.
- Damodaran, S. P. (2007). *Fennema's food chemistry*. . CRC press.
- FAO. (14 de Septiembre de 2015). Obtenido de FAO: <http://www.fao.org.mx>
- Fenik, J. T. (2011). Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 814-826.
- Fennema, O. R., Parkin, K. L., & Demodaran, S. (2007). *Fennema's food chemistry*. CRC press.



- Ferrer, I. G.-R.-A. (2005). Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry. . *Journal of Chromatography A*, 81-90.
- Food and Drug Administration. (1968). Pesticide analytical manual . Rockville, Md: Education and Welfare.
- Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA). (2008). Manual técnico del cultivo del aguacate Hass (Persea americana L.). Obtenido de Manual técnico del cultivo del aguacate Hass (Persea americana L.): [www.hondurasag.org](http://www.hondurasag.org).
- Gamon, M. L. (2001). Multiresidue determination of pesticides in fruit and vegetables by gas chromatography/tandem mass spectrometry. . *Journal of AOAC International*, 84(4), , 1209-1216.
- Hori, S. (2007). The Japanese Positive List System for Agricultural Chemical Residues in Foods and Food Additives. *FOODS AND FOOD INGREDIENTS JOURNAL OF JAPAN*, 496.
- Karmas, E. (s.f.). Techniques of measurement of moisture content of foods. *Food Technology*, 34-52.
- Lehotay, S. J. (2006). Multiclass, multiresidue analysis of pesticides, strategies. En J. W. Sons, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Ltd.
- Mastovska, K. (21. Mastovska K., 2013, Guía de análisis de referencia de plaguicidas por GC/MS/MS, Análisis de residuos, Agilent Technologies. , USA, de 2013). Guía de análisis de referencia de plaguicidas por GC/MS/MS, Análisis de residuos, Agilent Technologies. USA: Excellcon International LLC, Plymouth Meeting. 5991-2389EN. . doi:5991-2389EN
- Narong, C. O. (2013). Analysis of 136 pesticides in avodaco using a modified QuEChERS method with LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Journal for agriculture and food chemistry*, 61. doi:2315-2329
- NMX-CH-160-IMNC-2006. (2006). *Materiales de referencia- Términos y definiciones*.
- NMX-CH-165-IMNC-2008. (2008). *Materiales de referencia- Principios generales y estadísticos para la certificación*.
- Olusegun, A. y. (2013). Rapid Analytical Method: A rapid SPE Multiresidue Method for the Analysis of Polar and Nonpolar Pesticides in High Moisture Food products.
- Orrego Alzate, C. E. (2008). *Congelación y liofilización de alimentos*. Manizales, Caldas, Colombia: Universidad Nacional De Colombia.

- Otake T, I. N. (2009). Development of certified reference material for quantification of two pesticides in brown rice. *J Agric Food Chem*, 57. doi:8208-8212
- Otake, T. Y. (2011). Development of Green Onion and Cabbage Certified Reference Materials for Quantification of Organophosphorus and Pyrethroid Pesticides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59. doi:8568-8574
- P. Modanio Charles, C. F. (2001). Validación de un método analítico de HPLC para la determinación de permetrina y estudio de estabilidad. *unidad de farmacia clínica y farmacoterapia. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona*, [www.ub.es/farchi/WPO.htm](http://www.ub.es/farchi/WPO.htm).
- Park, Y., & Bell, L. (2002). Determination of moisture and ash contents of foods. En *Handbook of food analysis* (págs. 55-82). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Parzanese, M. (2011). Tecnologías para la industria alimentaria. *Liofilización de alimentos*. Buenos Aires, Argentina. Obtenido de [http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha\\_03\\_Liofilizados.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_03_Liofilizados.pdf)
- Pomeranz, Y., & Meloan, C. E. (1994). *Determination of moisture in Food Analysis: Theory and Practice* (3 ed.). New York: Chapman and Hall.
- Richardson, G. H. (1995). Standard Methods for the Examination of Dairy Products. *American Public Health Association*, 373.
- SAGARPA. (31 de Octubre de 2011). Recuperado el 11 de Junio de 2015, de Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación: <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/Monografias/Monografía%20del%20aguacate.pdf>
- SIAP. (2014). Recuperado el 2015, de SIAP: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>; [http://w6.siap.gob.mx/comercio/muestra\\_producto.php](http://w6.siap.gob.mx/comercio/muestra_producto.php);
- Stoeppler, M. W. (2001). *Reference materials for chemical analysis*. Wiley-VCH editorial.
- Terroni, E. (1997). *Manual básico de liofilización*. Medellín Colombia: Editorial office.
- Vogl, J. &. (2006). On the measurement of the moisture content in different matrix materials. *Accreditation and quality assurance*,, 356-362.
- Yuanxun, Z. Y. (1998). Development of IAEA-386 bovine liver candidate reference material in SINR. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*,, 231(1-2), 195-197.

Zeisler, R. S. (1993). The preparation of a cabbage candidate reference material to be certified for residues of agrochemicals. *Fresenius Journal of analytical chemistry*, 202-206.

# **APENDICE**

**Cuadro 24.-** Plaguicidas adicionados a los árboles de aguacate y su clasificación.

Plaguicida	Presentación adquirida	Cultivo	Plaga	Dosis	Dosis para 20 L	Recomendaciones
Acefato	Orthene Ultra (Pellets) composición: 97.0 % en peso Equivalente a 970 g de I.A./kg	Aguacatero (45)	Trips	(0.6-1.0) kg/ha	(60 – 100) g	- 2 aplicaciones al follaje por aspersión al detectar plagas. - Este producto es tóxico a peces, aves, crustáceos, animales silvestres y a las abejas. - No mezclar con productos de reacción alcalina.
Permetrina	Ambush 34 (concentrado emulsionable) Composición: 33.66 % en peso Equivalente a 70 g de I.A. /L	Aguacatero (14)	Gusano confeti	(200 - 300) mL/100 L de agua	4 mL	- Aplicar de (200-600) litros de agua por ha, utilizando aspersores de mochila o de tractor. - Repetir de ser necesario cada 5 días o más. - No se aplique cuando el cultivo esté en flor o las abejas libando. - Aplicación por aspersión al follaje.
			Minador de la hoja			
Metamidofos	Mattafox 600 LM (Líquido miscible) Composición: 50 % en peso Equivalente a 600 g de I.A./L	Berenjena 14	Gusano falso medidor	1.0 L/ha	200 mL	- Diluir en no menos de 100 L de agua /ha en aplicación con mochila. - No mezclar con productos de reacción alcalina. - Aplicación por aspersión al follaje.
			Gusano soldado	1.0 L/ha		
			Gusano del fruto	(1.0– 1.5) L/ha	300 mL	
			Pulgón mizus	(1.0– 1.5) L/ha		

Lambda cialotrina	Kendo 6.5 CE (Concentrado emulsionable) Composición: 6.50 % en peso Equivalente a 70 g de I.A. /L	Aguacater o (14)	Ácaro café	(0.4-0.6) L/ha	(40–60) mL	- No aplique en cultivos en flor o cuando las abejas estén libando. - Apoca de aplicación: en fructificación. - Aplicación por aspersión al follaje.
Metil paratión	Folial (Microencapsulado) Composición: 40.0 % en peso Equivalente a 450 g de I.A. / L	Calabaza (21)	Chicharritas, pulgones, gusano trozador y barrenadores de guías. trips	(1.0–1.5) L/ha	(100–150) mL	- Con aspersor manual se usan de 200 L a 400 L de agua/ha. - No se mezcle con compuesto de fuerte reacción alcalina.
		Durazno (14)	Frailecillo	125 cc/100 L de agua	25 mL	- No se aplique en cultivos en flor o cuando las abejas estén libando.
Dimetoato	Perfekthion (Concentrado emulsionable) Composición: 3.40 % en peso Equivalente a 400 g de I.A/L	Limonero, naranjo y toronjo (15)	Pulgón negro, mosquita blanca y trips de los cítricos	(175-200) cc/100 L de agua	(35–40) mL	- Aplicación terrestre con bombas de mochila, usar boquilla de cono 8004 - No aplicar cuando el cultivo esté en flor o cuando las abejas estén libando - No mezclar con plaguicidas de reacción fuertemente alcalina
Carbendazim (Derosal 500 D)	Disp.(Emulsión aceite en agua) Composición: 43 % Equivalente a 511 g/L	Aguacater o	Antracnosis (Colletotrichum sp)	(0.05-0.07) L/ha	(5–7) mL	Aplicación al follaje

Malatión (Polathion 1 000)	Concentrado emulsionable Composición: 83.7 % Equivalente a 1 000 g/L	Aguacatero (7)	Palomilla del hueso del aguacatero (Stenoma catenifer)	1.25 L/ha	125 mL	Aplicación al follaje
----------------------------------	---	-------------------	--	--------------	--------	-----------------------

( ) en el cultivo, son los días entre la última aplicación y la cosecha.

- En donde no se especifica el volumen de agua se tomó la recomendación de manejar un volumen de 200 L.

I.A. = ingrediente activo

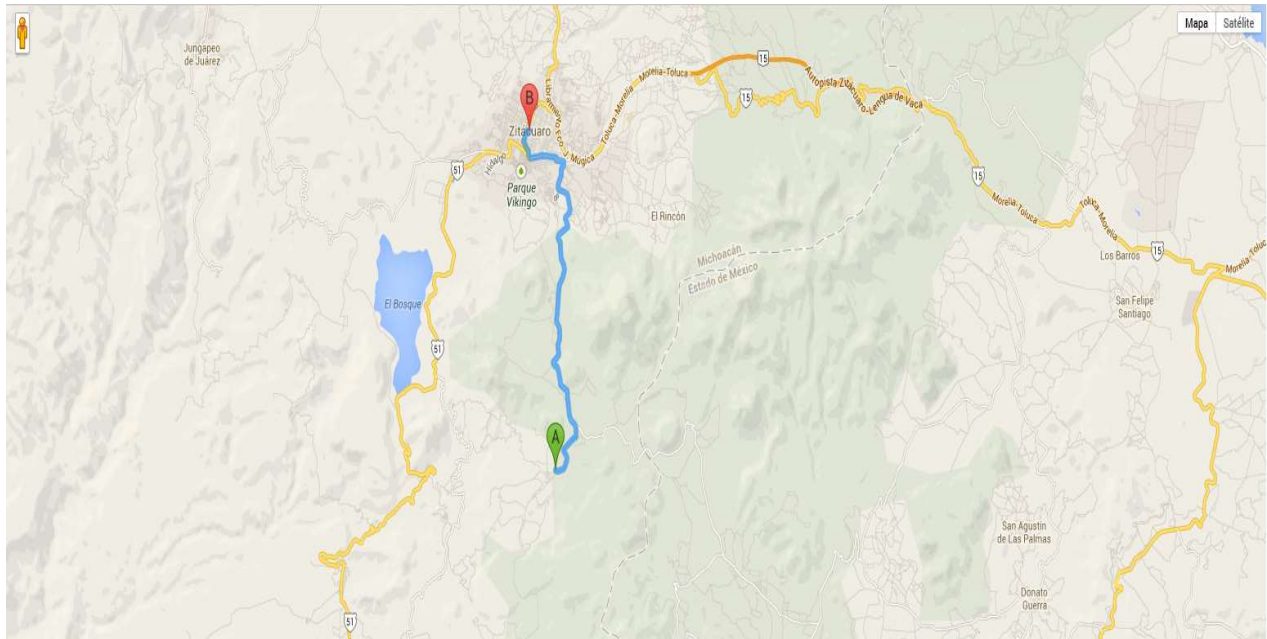
(SENASICA, 2011; APEAM, 2012).

**Localización de los árboles.** Los árboles de aguacate se expusieron a algunos plaguicidas, éstos están ubicados en México, en el estado de Michoacán (Rancho las Pilas, Aputzio de Juárez, Michoacán, México (Figura 3).

Las Pilas se localiza en el Municipio de Zitácuaro del Estado de Michoacán de Ocampo México y se encuentra en las coordenadas GPS:

Longitud (dec): -100.354722

Latitud (dec): 19.355000



**Figura 30.-** Coordenadas de localización del rancho las pilas.

La localidad se encuentra a una mediana altura de 2010 metros sobre el nivel del mar.



**Cuadro 25.-** Relación de árboles expuestos a plaguicidas de manera individual.

<b>Código</b>	<b>No. de árbol</b>	<b>Período</b>	<b>Dosis en 20 L/aplicación</b>
1i	1	25/06/2013 al 12/10/2013	60 g/13
2i	17	16/07/2013 al 7/11/2013	50 mL/13
3i	11	9/07/2013 al 7/12/2013	35 mL/16
4i	7	9/07/2013 al 7/12/2013	50 mL/16
5i	16	16/07/2013 al 7/12/2013	50 mL/15
6i	3	25/06/2013 al 7/11/2013	100 mL/15
7i	9	9/07/2013 al 13/12/2013	25 mL/16
8i	5	9/07/2013 al 13/12/2013	5 mL/16

**Cuadro 26.-.** Obtención del % de humedad y correcciones por empuje del aire de la charola vacía (blanco).

Charola + muestra												
Fecha	Tiempo (Días)	Deriva (g)	Peso (g)	Deriva (g)	Peso muestra (g)	m corr der y error ind (g)	T (°C)	P (hPa)	Hr (%)	Densidad Aire (Kg/m <sup>3</sup> )	m con corrección Empuje de aire (g)	Diferencias
13/03/2015 09:24	0	0	30.4782	0	0.00026	0.000274	19.49	807.58	44.9	0.95714	0.00027	
20/03/2015 10:48	7.06	0	30.47861	0.00001	0.00067	0.000679	18.97	810.15	58.07	0.96076	0.00068	0.00041
24/03/2015 14:45	11.22	0	30.4783	0	0.00036	0.000374	18.77	806.56	48.82	0.95810	0.00037	-0.00031
27/03/2015 15:26	14.25	0	30.47866	0	0.00072	0.000734	19.21	808.53	52.28	0.95854	0.00073	0.00036
06/04/2015 16:02	24.28	0	30.47836	0.00004	0.00042	0.000414	18.51	805.24	48.07	0.95753	0.00041	-0.00032
14/04/2015 11:06	32.07	0	30.47846	0	0.00052	0.000534	18.57	810.81	58.11	0.96300	0.00053	0.00012
21/04/2015 16:40	39.30	0.00003	30.4785	0.00005	0.00056	0.000534	18.89	804.65	53.58	0.95493	0.00053	0.00000

## ABREVIATURAS

ALS	Muestreador líquido automático
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APEAM	Asociación de productores y empaques exportadores de aguacate de Michoacán
ANOVA	Análisis de varianza
aw	Actividad del agua
CE	Comunidad Europea
CENAM	Centro Nacional de Metrología
CFR	Code of Federal Regulations
CG	Cromatografía de Gases
CI	Ionización química
CICLOPLAFEST	Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
CV	Coeficiente de variación
DCE	Detector de conductividad electrolítica
DE	Desviación estándar
DGICURG	Dirección General de Investigación sobre la Contaminación Urbana y Regional
dSPE	Extracción en fase sólida dispersiva
EI	Estándar interno
ESI	Fuente de ionización por electrospray
ETAs	Enfermedades transmitidas por alimentos
eV	Electron Volt
FAO	Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FDA	Food and Drug Administration
FHIA	Fundación Hondureña de Investigación Agrícola
GC/MS	Cromatografía de gases/espectrometría de masas, un solo cuadrupolo
GC/MS/MS	Cromatografía de gases/espectrometría de masas triple cuadrupolo
GCB	Negro de carbón grafitado
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución

INECC	Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático
LC/MS/MS	Cromatografía de líquidos/espectrometría de masas
LMR	Límite máximo residual
MR	Material de referencia
MRC	Material de referencia certificado
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Un cuadrupolo
MS/MS	Triple cuadrupolo
<i>m/z</i>	Masa/carga
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPPS	Plaguicidas organofosforados
PSA	Amina primaria/secundaria
Q <sub>0</sub>	Pares de iones uno
Q <sub>1</sub>	Pares de iones dos
Q <sub>2</sub>	Pares de iones tres
QuEChERS	Método de extracción rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca Alimentación
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
SIM	Monitoreo de ion seleccionado
SPE	Extracción en fase sólida
USA	Estados Unidos de Norteamérica