



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**“LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS E INTERVALOS DE
SEGURIDAD DE PLAGUICIDAS EN TUNA, *Opuntia*
ficus-indica”**

CRISTÓBAL ALDAMA AGUILERA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2008

La presente tesis titulada: **Límites máximos de residuos e intervalos de seguridad de plaguicidas en tuna, *Opuntia ficus-indica***, realizada por el alumno **Cristóbal Aldama Aguilera**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: **DR. JUAN CIBRIÁN TOVAR**

ASESOR: **DR. HUSSEIN SÁNCHEZ ARROYO**

ASESOR: **DRA. SOCORRO ANAYA ROSALES**

ASESOR: **DRA. MERCEDES GUADALUPE LÓPEZ PÉREZ**

ASESOR: **DR. MARCOS SOTO HERNÁNDEZ**

Montecillo, Texcoco, Estado, de México, octubre de 2008

LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS E INTERVALOS DE SEGURIDAD DE PLAGUICIDAS EN TUNA, *OPUNTIA FICUS-INDICA*

Cristóbal Aldama Aguilera, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2008

Dado que no existen plaguicidas registrados para el manejo fitosanitario de las plagas que afectan la producción de tuna, *Opuntia ficus-indica* (L) Miller 1768, se propusieron límites máximos de residuos (LMRs) de siete plaguicidas en esta fruta. En la evaluación del riesgo dietético crónico se estimaron los niveles de exposición con los métodos de Ingesta Diaria Teórica Máxima (IDTM) e Ingesta Diaria Estimada (IDE). En 2006, se realizaron dos aplicaciones de los plaguicidas malatión, clorpirifos, permetrina, diazinón y dimetoato a la dosis máxima recomendada en las etiquetas. A partir de la segunda aplicación, se realizaron muestreos a los 0, 3, 7, 14, 21 y 28 días después de la aplicación (DDA) y la determinación de sus residuos se hizo por cromatografía de gases y espectrometría de masas. En 2007, se aplicaron spinosad y abamectina, se muestreó a los 0, 1, 3, 7 y 14 DDA y sus residuos se analizaron por cromatografía de líquidos y detector de arreglo de diodos. Las curvas de disipación se definieron matemáticamente para establecer las relaciones óptimas entre los residuos de plaguicidas y el tiempo. Los LMRs propuestos de malatión, clorpirifos, permetrina, diazinón, dimetoato, spinosad y abamectina en tuna son 8.0, 1.0, 3.0, 0.5, 2.0, 0.3 y 0.1 mg kg⁻¹, respectivamente. Las IDTMs o IDEs no excedieron las IDAs. Los parámetros de validación para los análisis de residuos de plaguicidas estuvieron dentro de los valores de referencia aceptables y los límites de cuantificación fueron menores a los LMRs propuestos. Los intervalos de seguridad propuestos para los plaguicidas en tuna son de 4, 17, 4, 10, 16, 5 y 2 días, respectivamente.

Palabras clave: evaluación del riesgo, análisis de residuos de plaguicidas, curvas de disipación, intervalo precosecha.

MAXIMUM RESIDUE LIMITS AND SAFETY INTERVALS OF PESTICIDES IN PRICKLY PEAR CACTUS FRUIT, *Opuntia ficus-indica*

Cristóbal Aldama Aguilera, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2008

Given that there are not registered pesticides available for phytosanitary control of pest affecting the production of prickly pear cactus fruit, *Opuntia ficus-indica* (L) Miller 1768, maximum residue limits (MRLs) of seven pesticides were proposed in this fruit. In the chronic dietary risk assessment, the levels of exposure were estimated through the theoretical maximum daily intakes (TMDIs) and estimated daily intake (EDIs) methods. In 2006, the insecticides malathion, chlorpirifos, permethrin, diazinon and dimethoate were applied two times at maximum labeled doses. From the second application, the samplings were carried out at 0, 3, 7, 14, 21 and 28 days after application (DAA) and the residue determination were made by gas chromatography and mass spectrometry. In 2007, the pesticides spinosad y abamectin were applied and the samplings were made at 0, 1, 3, 7 and 14 DAA and the residues were analyzed by liquid chromatography with diode array detector. Mathematically defined decline curves were established by determining optimal relationship between pesticide residues and time. The proposed MRLs of malathion, chlorpirifos, permethrin, diazinon, dimethoate, spinosad and abamectin in prickly pear cactus are 8.0, 1.0, 3.0, 0.5, 2.0, 0.3 and 0.1 mg kg⁻¹, respectively for each pesticide. The TMDIs or EDIs did not exceed their ADIs. The validation parameters for pesticide residue analysis were between the acceptable reference values and the quantitation limits were lower than the proposed MRLs. The proposed safety intervals for the pesticides in prickly pear cactus fruit are 4, 17, 4, 10, 16, 5 and 2 days, respectively.

Key words: risk assessment, pesticide residue analysis, decline curves, preharvest intervals.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca para la realización de mis estudios de doctorado y por el financiamiento otorgado a través del programa de apoyos integrales a tesis de doctorado.

Al Colegio de Postgraduados por la formación académica a través del Postgrado de Fitosanidad.

Al Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX) por el financiamiento otorgado a través del proyecto “15-2006-1002, Inocuidad alimentaria en la producción de nopal tuna”.

Al Dr. Juan Cibrián Tovar por su asesoría, dirección y apoyo durante el desarrollo de esta investigación.

A los doctores Hussein Sánchez Arroyo, Socorro Anaya Rosales y Mercedes G. López Pérez por la asesoría brindada en la realización de esta tesis.

Al Dr. Marcos Soto Hernández por su asesoría y facilidades prestadas en el análisis de residuos de plaguicidas en el laboratorio de Fitoquímica.

Al M. C. Rubén San Miguel Chávez por el entrenamiento y capacitación en el manejo del cromatógrafo de líquidos.

Al Ing. Fernando Ignacio Nájera Mendoza, coordinador de la Campaña Manejo fitosanitario del cultivo de nopal del CESAVEM, por su apoyo en los trabajos de campo.

A los ingenieros Cesar Morales Morales y Jesús Morales Gómez por su gran apoyo en la realización de los trabajos de campo.

Al Sr. Nicolás Martínez, propietario de una de las parcelas experimentales.

A todos los productores de tuna de la región del Valle de Teotihuacán.

A Steven Lehotay (ARS, USDA), por aportar algunas sugerencias en la extracción de residuos de plaguicidas.

A Manuel Campos Figueroa, por su apoyo con material bibliográfico.

A la Dra. Obdulia Segura León, por el apoyo en el almacenamiento de muestras de tuna.

A los Doctores Celina Ilanderal Cázares y Néstor Bautista Martínez, quienes siempre me han apoyado.

Al Patronato Pro-estudiantes Sonorenses.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Ecología Química de Insectos: Julio C. Velázquez, Carlos Acatitla, Roberto Flores, Israel Barrientos y Cindy Espinosa. También a quienes alguna vez formaron parte del equipo: José Ma. Fierro, Juliana Osorio, Pascual Sánchez, Manolo Muñiz, Érica Muñiz, Gloria Calyecac, María de J. Ramírez, Ramón Cuellar, Mario Poot y J. Rey Moreno.

Dedico esta tesis a:

Alejandro

Isaac

Alan

Karen

Marcopolo

Vanessa

Eduardo

Ilean

Daniela

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Planteamiento del problema.....	1
2. Objetivos.....	1
3. Hipótesis.....	1
4. Revisión de literatura.....	2
4.1. Producción de tuna y el uso de plaguicidas.....	2
4.2. Límites máximos de residuos y ensayos supervisados.....	3
4.3. Evaluación del riesgo de plaguicidas.....	4
4.4. Determinación de residuos de plaguicidas.....	8
5. Literatura citada.....	9
CAPITULO I. LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS Y EVALUACIÓN DEL RIESGO DIETÉTICO DE PLAGUICIDAS EN TUNA	12
1.1. RESUMEN.....	12
1.2. ABSTRACT.....	13
1.3. INTRODUCCIÓN.....	14
1.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
1.4.1. Establecimiento de LMRs.....	15
1.4.2. Evaluación del riesgo.....	15
1.4.2.1. Caracterización de la peligrosidad (Toxicología).....	15
1.4.2.2. Evaluación de la exposición y caracterización del riesgo.....	16
1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
1.5.1. Límites Máximos de Residuos propuestos.....	16
1.5.2. Evaluación del riesgo.....	18
1.5.2.1. Caracterización de la peligrosidad (Toxicología).....	18
1.5.2.2. Evaluación de la exposición y caracterización del riesgo.....	19
1.6. CONCLUSIONES.....	24
1.7. LITERATURA CITADA.....	25
CAPITULO II. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN TUNA POR CROMATOGRFÍA DE GASES Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS	28
2.1. RESUMEN.....	28
2.2. ABSTRACT.....	29
2.3. INTRODUCCIÓN.....	30
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
2.4.1. Preparación de la muestra.....	32
2.4.1.1. Estándares y reactivos.....	32
2.4.1.2. Homogeneización, extracción y partición de las muestras.....	32
2.4.1.3. Muestra equivalente en la solución final.....	33
2.4.2. Determinación.....	34
2.4.3. Parámetros de validación.....	35
2.4.3.1. Linealidad, rango analítico e interferencias.....	35
2.4.3.2. Límites de detección y de cuantificación.....	35

2.4.3.3. Recuperación: precisión y exactitud.....	36
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
2.5.1. Parámetros de validación.....	36
2.5.1.1. Linealidad, rango analítico e interferencias.....	36
2.5.1.2. Límites de detección y de cuantificación.....	41
2.5.1.3. Recuperación: precisión y exactitud.....	43
2.6. CONCLUSIONES.....	44
2.7. LITERATURA CITADA.....	44
CAPÍTULO III: DETERMINACIÓN DE SPINOSAD Y ABAMECTINA EN TUNA POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS CON DETECTOR DE ARREGLO DE DIODOS.....	47
3.1. RESUMEN.....	47
3.2. ABSTRACT.....	48
3.3. INTRODUCCIÓN.....	49
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
3.4.1. Preparación de la muestra.....	51
3.4.1.1. Estándares y reactivos.....	51
3.4.1.2. Pasos preliminares y homogeneización de la muestra.....	51
3.4.1.3. Extracción y purificación: método QuEChERS.....	52
3.4.2. Determinación.....	52
3.4.3. Parámetros de validación.....	52
3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
3.5.1. Optimización.....	53
3.5.1. Parámetros de validación.....	54
3.6. CONCLUSIONES.....	58
3.7. LITERATURA CITADA	58
CAPÍTULO IV. INTERVALOS DE SEGURIDAD DE PLAGUICIDAS EN TUNA.....	61
4.1. RESUMEN.....	61
4.2. ABSTRACT.....	62
4.3. INTRODUCCIÓN.....	63
4.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
4.4.1. Aplicaciones en campo.....	64
4.4.2. Muestreo.....	65
4.4.3. Determinación de residuos de plaguicidas.....	66
4.4.3. Cálculo de los intervalos de seguridad.....	66
4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
4.5.1. Condiciones ambientales.....	67
4.5.2. Residuos.....	67
4.5.3. Intervalos de seguridad.....	73
4.6. CONCLUSIONES.....	74
4.7. LITERATURA CITADA.....	74
CONCLUSIONES GENERALES.....	77

Lista de Cuadros

	Página
Cuadro 1. Principales pruebas toxicológicas para la identificación de la peligrosidad en animales.....	6
Cuadro 2. Límites máximos de residuos (LMR) propuestos de los plaguicidas en tuna.....	17
Cuadro 3. Información toxicológica de los plaguicidas sobre mamíferos.....	18
Cuadro 4. Cálculo del consumo <i>per cápita</i> de los alimentos que no se detallan en las hojas de balance alimenticio para México, de la FAO.....	19
Cuadro 5. Ingesta Diaria Teórica Máxima (IDTM) de Malatión en México.	20
Cuadro 6. Ingesta Diaria Teórica Máxima (IDTM) de Clorpirifos y permetrina en México.....	21
Cuadro 7. Ingesta Diaria Teórica Máxima (IDTM) de spinosad y abamectina en México.....	22
Cuadro 8. Ingesta Diaria Teórica Máxima (IDTM) e Ingesta Diaria Estimada (IDE) de diazinón y dimetoato en México.....	23
Cuadro 9. Iones utilizados para la cuantificación e identificación de los plaguicidas.....	34
Cuadro 10. Linealidad encontrada en los plaguicidas estudiados.....	37
Cuadro 11. Límites de detección y cuantificación instrumental de los plaguicidas en disolvente analizados por CG-EM.....	42
Cuadro 12. Límites de detección (L_{DM}) y cuantificación (L_{QM}) del método para los plaguicidas en tuna	43
Cuadro 13. Linealidad encontrada dentro del rango de 0.1 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de spinosad y abamectina analizados por HPLC-DAD.....	54
Cuadro 14. Límites de detección (L_{DI}) y cuantificación (L_{QI}) instrumental de los plaguicidas en disolvente analizados por HPLC-DAD.....	56

Cuadro 15.	Porcentajes de recuperación, límites de detección (L_{DM}) y cuantificación (L_{QM}) del método para spinosad y abamectina en tuna.....	56
Cuadro 16.	Curva de calibración en extracto de matriz (n=5) de spinosad y abamectina.....	57
Cuadro 17.	Plaguicidas aplicados en tuna y datos de calibración de la aplicación.....	65
Cuadro 18.	Residuos ($mg\ kg^{-1}$) de diazinón, dimetoato, malatión y clorpirifos en tuna y porcentaje de disipación (% Dis) a través del tiempo.....	69
Cuadro 19.	Residuos ($mg\ kg^{-1}$) de permetrina y porcentaje de disipación (% Dis) en tuna a través del tiempo.....	69
Cuadro 20.	Residuos ($mg\ kg^{-1}$) de spinosad y abamectina y porcentaje de disipación (% Dis) en tuna a través del tiempo.....	70
Cuadro 21.	Curvas de disipación de siete plaguicidas en tuna.....	71
Cuadro 22.	Tiempos de vida media ($T/2$) en días y a 90% de reducción ($T/10$) de los siete plaguicidas en tuna a 95% de nivel de confianza.....	73
Cuadro 23.	Tiempo requerido (Valor predicho) para que los residuos de plaguicidas disminuyen a sus respectivos LMRs propuestos en tuna a 95% de nivel de confianza.....	74

Lista de Figuras

		Página
Figura 1.	Evaluación del riego de plaguicidas agrícolas. Fuente: Renwick, 2002.....	7
Figura 2.	Espectros de masas y estructuras de los plaguicidas estudiados. pe= punto de ebullición; pm= peso molecular.....	35
Figura 3.	Cromatograma de iones totales de los estándares de los plaguicidas en acetona.....	37
Figura 4.	Cromatograma de iones totales de un blanco de extracto de tuna.....	38
Figura 5.	Cromatogramas de iones totales de un blanco de extracto de tuna. Las flechas indican el momento de elución de los plaguicidas.....	38
Figura 6.	Cromatogramas de iones totales de extracto de tuna adicionada con los plaguicidas.....	38
Figura 7.	Cromatogramas de iones extraídos en muestras de tuna. Blancos de matriz (A, B y C); iones de cuantificación de dimetoato, diazinón y malatión, respectivamente, en una muestra de tuna adicionada con los plaguicidas (D, E y F); iones característicos de dimetoato, diazinón y malatión, respectivamente (G, H e I).....	40
Figura 8.	Cromatogramas de iones extraídos en muestras de tuna. Blancos de matriz (A y B); iones de cuantificación de clorpirifos y permetrina, respectivamente, en una muestra de tuna adicionada con los plaguicidas (C y D); iones característicos de clorpirifos y permetrina, respectivamente (E y F).....	41
Figura 9.	Porcentajes de recuperación de los plaguicidas estudiados. Las barras de error representan la desviación estándar relativa.....	44
Figura 10.	Estructuras de las espinosinas A y D.....	49
Figura 11.	Estructuras de abamectina B1a y B1b.....	49
Figura 12.	Cromatograma de un blanco de matriz (A) y spinosad fortificado a 0.1 µg mL (B).....	55

Figura 13. Cromatograma de un blanco de matriz (arriba) y abamectina fortificado a $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (abajo).....	55
Figura 14. Porcentajes de recuperación de spinosad y abamectina con el método de extracción QuEChERS y la determinación por HPLC y DAD. Las barras de error representan la desviación estándar relativa.....	57
Figura 15. Curva de disipación de diazinón en tuna en función logarítmica. Las líneas discontinuas indican los intervalos de confianza (IC) y de predicción (IP); la línea vertical indica el intervalo de seguridad al LMR propuesto ($\log [0.5 \text{ mg kg}^{-1}]$, línea horizontal).....	72
Figura 16. Curva de disipación de diazinón en tuna en función exponencial (con antilogaritmos). Las líneas discontinuas muestran los intervalos de confianza (IC) y de predicción (IP)..	72

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Planteamiento del problema

El cultivo de tuna, *Opuntia* spp, es importante en nuestro país por aspectos sociales y económicos, ya que el valor de la producción en 2005, se estimó en 778,604,096.50 pesos (SIAP-SIACON, 2006). En diferentes épocas del año, la producción de tuna se ve afectada por varias plagas que reducen significativamente el rendimiento y se conocen plaguicidas que son eficaces para el control de estas plagas y algunos están registrados para su uso en diferentes países (Longo y Rapisarda, 1995). Uno de los inconvenientes para la producción de tuna es que no existen plaguicidas registrados o autorizados para el manejo fitosanitario del cultivo en México (CICOPLAFEST, 2004). La industria de plaguicidas muestra poco interés por registrar plaguicidas para nopal tuna debido a la baja superficie dedicada al cultivo, lo que repercute en bajas expectativas de recuperación de inversión por registro.

2. Objetivos

- 2.1. Proponer límites máximos de residuos de malatión, clorpirifos, permetrina, diazinon, dimetoato, spinosad y abamectina en tuna.
- 2.2. Validar la determinación de los residuos en tuna de malatión, clorpirifos, permetrina, diazinon y dimetoato por cromatografía de gases y espectrometría de masas, y de spinosad y abamectina por cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos.
- 2.3. Obtener sus curvas de disipación para determinar los intervalos de seguridad para tuna.

3. Hipótesis

- 3.1. Para evitar que los residuos de plaguicidas causen efectos adversos a la salud de los consumidores de tuna es posible establecer límites máximos de residuos de clorpirifos, permetrina, diazinón, malatión, dimetoato, spinosad y abamectina.

- 3.2. Mediante las técnicas analíticas de cromatografía de gases y espectrometría de masas, y cromatografía de líquidos con detección ultravioleta es posible la determinación de residuos de clorpirifos, permetrina, diazinón, malatión, dimetoato, spinosad y abamectina en tuna a niveles de partes por millón.
- 3.3. Después de cierto tiempo los niveles de residuos de los plaguicidas en tuna están por debajo de los límites máximos de residuos propuestos.

4. Revisión de literatura

4.1. Producción de tuna y el uso de plaguicidas

El nopal se ha utilizado en México desde épocas prehispánicas, donde jugó un papel importante en la economía agrícola del Imperio Azteca. El maíz (*Zea mays*), el agave (*Agave* spp.) y el nopal fueron los primeros cultivos presentes en nuestro país (Anaya-Pérez, 2001). El Estado de México, Zacatecas, Puebla, Hidalgo, Jalisco y San Luis Potosí producen 96.6% del total del volumen de producción de tuna (*Opuntia* spp) y en 2005, se cultivaron más de 50,146 ha con tuna con una producción de 366,383 toneladas (SIAP-SIACON, 2006) y dado que la población en México en 2005 fue de 103,263,388 habitantes (INEGI, 2006) se estima un consumo *per cápita* anual de 3.55 kg de tuna.

Las principales plagas de la tuna en México son: la cochinilla silvestre, algodoncillo o chahuistle blanco (*Dactylopius* spp), la chinche roja (*Hesperolabops* spp), la chinche gris (*Chelinidae* spp) y trips (*Sericothrips opuntiae*) (Badii y Flores, 2001; Longo y Rapisarda, 1995). Otras plagas que se presentan en el cultivo son: el picudo barrenador (*Metamasius spinolae*), el picudo de las espinas (*Cylindrocoptorus birradiatus*), el gusano blanco (*Lanifera cyclades*), el gusano cebra (*Olycella nephelepsa*), caracoles (*Helix aspersa*), entre otras (De la Rosa y Santana, 1998). Borrego y Burgos (1986) también mencionan a la gallina ciega (*Phyllophaga* spp), al gusano de alambre

(*Melanotus* spp), a las diabroticas (*Diabrotica* spp) y a un nematodo (*Heterodera cacti*) como plagas presentes en el suelo que afectan la producción de tuna.

Aún cuando no hay plaguicidas registrados en tuna en el catalogo oficial de plaguicidas (CICOPLAFEST, 2004), en algunas publicaciones sobre nopal en México (Borrego y Burgos, 1986; Granados y Castañeda, 1991; De la Rosa y Santana, 1998; Badii y Flores, 2001; Mena y Rosas, 2004) recomiendan el uso de insecticidas de diferentes grupos químicos.

Los plaguicidas se usan diaria e internacionalmente a una escala masiva en la protección de cultivos, la preservación de alimentos y el control de insectos vectores, plagas urbanas y parásitos de animales domésticos (Skidmore *et al.*, 1997). Éstos, han otorgado inmensos beneficios a la humanidad al contribuir significativamente a mejorar la salud, la nutrición y la economía ya que se obtienen alimentos en mayor cantidad y más baratos (Ballantyne y Marrs, 2004). Los plaguicidas pertenecen a numerosas clases químicas, las cuales tienen el potencial de producir efectos adversos en organismos vivientes (Harris y Hill, 2004). Estos agroquímicos representan un peligro para el medio por los efectos secundarios indeseables que causan y por el riesgo para el consumidor a causa de residuos tóxicos que los alimentos pudieran contener (Coscolla, 1993).

4.2. Límites máximos de residuos y ensayos supervisados

Históricamente, los niveles de residuos de plaguicidas (RdP) en los alimentos han sido comparados con estándares conocidos como límites máximos de residuos (LMRs) (Harris y Hill, 2004). El LMR es la máxima concentración de residuos de un plaguicida que resulta de su uso cuando éste se lleva a cabo bajo una práctica agrícola correcta (WHO, 1997). Debe estar reconocido y aceptado legalmente para cada plaguicida en cada alimento; se expresa en mg kg⁻¹ o en partes por millón (Cabras, 2003).

Desde 1966, la Reunión Conjunta sobre Residuos de Plaguicidas (JMPR, Joint Meeting on Pesticide Residues) de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) y la OMS (Organización Mundial

de la Salud) ha establecido LMRs de plaguicidas en los alimentos para proteger la salud de los consumidores y para facilitar el comercio de los productos tratados (WHO, 1990). La FAO propone, para los estudios del comportamiento de RdP en cultivos o alimentos, los denominados ensayos supervisados, orientados al establecimiento de LMRs y también contribuyen al conocimiento de las formas en que ocurre la degradación, disipación o decadencia para determinar los plazos de seguridad (intervalo pre-cosecha), lo que facilita la autorización (registro) del uso de un plaguicida en determinado(s) cultivo(s) (FAO, 2002). En estos ensayos se efectúan experimentos de campo con aplicaciones de plaguicidas en condiciones seleccionadas y conocidas respecto de localidad, especie/variedad, condiciones agroecológicas, modo de aplicación, dosis y formulación, número y oportunidad de aplicación, métodos de muestreo representativo, programa fitosanitario, entre otras variables (US EPA, 1996). Estos experimentos se deben efectuar en el contexto del último uso (aplicaciones lo más tardías posibles con respecto a la cosecha) y máximo número de aplicaciones recomendadas (Coscolla, 1993).

Muchas especies de plantas son cultivadas para obtener alimentos y son vagamente llamados cultivos menores, estos cultivos menores son cultivados en pequeñas cantidades y el costo de estudios de residuos y ensayos no son atractivos para la iniciativa privada debido al valor de la producción de dichos cultivos (Harris y Hill, 2004). El establecimiento de LMRs de plaguicidas en cultivos menores es complicado debido al alto costo del desarrollo de productos (en la generación de datos [residuos, eficacia] y en el proceso de registro) y a la recuperación de la inversión con ganancias (Muller, 2007).

4.3. Evaluación del riesgo de plaguicidas

El manejo fitosanitario actual de los cultivos depende en grado importante del uso de plaguicidas, pero la utilización de estos productos genera Residuos de Plaguicidas en los cultivos (Ballantyne y Marrs, 2004). Estos RdP persisten o se disipan de diferente forma según sus características, condiciones de aplicación y del ambiente (Cortinas *et al.*, 2000).

Un compuesto tóxico puede entrar al cuerpo principalmente por inhalación, ingestión o absorción dérmica y puede causar daños en el sitio de contacto o ser absorbido, transportado y distribuido por la sangre hasta alcanzar diversos órganos (WHO, 1990). Las posibles consecuencias de la exposición a sustancias tóxicas incluyen una amplia gama de efectos agudos y crónicos, reversibles o irreversibles que pueden ir desde los más leves y comunes, como por ejemplo la irritación de la piel y las mucosas, hasta aquellos en los que puede ocurrir afectación del sistema inmunológico, endocrino, daño hepático, renal o neurológico, alteraciones reproductivas o producir malformaciones congénitas, cambios hereditarios o padecimientos malignos, como el cáncer (Evans *et al.*, 2003).

La evaluación de riesgos es una herramienta que se sustenta en el conocimiento de las propiedades que hacen peligrosos a los plaguicidas y capaces de producir daños a la salud de los seres humanos y de los demás organismos vivos, en función de la exposición (Renwick, 2002). Es un proceso dividido en cuatro pasos: la identificación de su peligrosidad, la evaluación de sus efectos, la evaluación de la exposición y la caracterización del riesgo (WHO, 1999).

Identificación de la peligrosidad: involucra una serie de estudios *in vivo* e *in vitro* para definir las propiedades biológicas del químico que podrían derivar en efectos adversos (Cuadro 1) (WHO, 1999). En todas las pruebas, el nivel de exposición se incrementa en los organismos bajo estudio (estudios microbiales, celulares o en animales *in vivo*) hasta que se produce un efecto adverso (Renwick, 2002).

Caracterización de la peligrosidad: En esta fase se busca establecer una relación cuantitativa entre la dosis de un compuesto tóxico recibida por los distintos organismos estudiados y la incidencia de un efecto adverso a la salud específico ya sea agudo o crónico (Cortinas *et al.*, 2000). En esta etapa se definen las relaciones dosis o concentración-respuesta, para establecer los

niveles que puede ingerir un humano sin que le cause efectos adversos a la salud como la IDA (Renwick, 2002).

Cuadro 1. Principales pruebas toxicológicas para la identificación de la peligrosidad en animales.

<u>Estudio</u>	<u>Descripción</u>
Toxicidad genética	Pruebas a corto plazo diseñadas para determinar actividad en una variedad de puntos finales (órganos), se utilizan mamíferos o bacterias.
Toxicidad oral aguda	Utiliza dosis únicas para definir el alcance de la toxicidad en la ausencia de otros datos (DL ₅₀).
Toxicidad a corto plazo	Dosis diarias repetidas durante 14-28 días; proveen indicadores útiles de potencial tóxico cuando se alían con pruebas clínicas y patológicas sensibles; puede ser usada para determinar dosis agudas de referencia (DARf).
Toxicidad subcrónica	Dosis diarias repetidas durante 90 días; provee información sobre los sitios de mayor toxicidad y efecto; útil para diseñar estudios crónicos; puede ser usada para determinar DARf o Ingesta Diaria Aceptable (IDA).
Toxicidad a largo plazo (crónica) y cancerogenicidad	Dosis diarias repetidas durante 2 años en roedores y un año en otros animales; los datos de estos estudios son frecuentemente la base para la evaluación del riesgo y la determinación de la IDA.
Toxicidad reproductiva	Dosis diarias repetidas antes, durante y después de la gestación para determinar efectos en fetos y neonatos en desarrollo y posibles efectos heredables; puede determinar DARf y/o IDA.
Inmunotoxicidad	Investigaciones sobre la estructura y/o funcionamiento de los tejidos y células responsables de la actividad e integridad de la respuesta inmune; integrados dentro de los estudios a corto plazo y subcrónicos; puede determinar DARf y/o IDA.
Neurotoxicidad	Investigaciones sobre la estructura y funcionamiento del sistema nervioso (ej: pruebas de comportamiento; integrados dentro de los estudios a corto plazo y subcrónicos; puede determinar DARf y/o IDA.

Fuente: Renwick, 2002.

Evaluación de la exposición: Además de conocer las propiedades físicas, químicas y tóxicas de los plaguicidas, se requiere conocer o estimar los niveles de exposición a los que están sujetos los seres humanos y otros organismos, que pueden tener lugar en las localidades en las que se aplican (o aplicarán) o a las que llegarán al difundirse en el ambiente o a través de la cadena alimentaria (Evans *et al.*, 2003). La dificultad es contar con datos que

permitan determinar las distintas modalidades de exposición que pueden tener lugar.

Caracterización del Riesgo: Consiste en comparar los niveles de exposición con valores umbrales individuales (ejemplo: IDA) para contaminantes por debajo de los cuales no hay un riesgo apreciable (WHO, 1999). Estos umbrales son derivados de la caracterización de la peligrosidad.

Con base en la evaluación de riesgos se pueden establecer prioridades de acción para prevenir, controlar o remediar los daños derivados del manejo de los plaguicidas (WHO, 1990). A partir de esas evaluaciones, también, se pueden fijar los límites máximos permisibles de los plaguicidas en distintos medios y los LMRs en productos agrícolas (Figura 1) (Renwick, 2002). En el caso de nuevos plaguicidas, la evaluación de riesgos permite identificar si éstos son excesivos, en cuyo caso se puede prohibir su ingreso al comercio, o decidir la aprobación de su comercialización y las medidas a adoptar para prevenir riesgos y lograr su manejo seguro. En el caso de los plaguicidas existentes, lo ideal para evaluar la exposición real es contar con datos de monitoreo de los diferentes medios (agua, suelo, aire), de organismos expuestos (no objetivo) y de los alimentos que se trataron (Hamilton *et al.*, 1997).



Figura 1. Evaluación del riesgo de plaguicidas agrícolas. Fuente: Renwick, 2002.

En este sentido, la JMPR de la FAO y la OMS año tras año llevan a cabo evaluaciones sobre residuos de plaguicidas en los alimentos (Cabras, 2003). El panel de expertos de la FAO es el encargado de revisar los residuos (LMRs) y los aspectos analíticos de los plaguicidas, el grupo de evaluación de la OMS se encarga de revisar aspectos toxicológicos y datos relacionados, entre ellos, el establecimiento de la Ingesta Diaria Aceptable (IDA) de cada plaguicida (WHO, 1997).

4.4. Determinación de residuos de plaguicidas

Para monitorear los residuos de plaguicidas a niveles por debajo de los LMRs se han desarrollado varios métodos de análisis (Guo y Zhang, 2005). En general, los métodos analíticos requieren el análisis con procedimientos simples y altos porcentajes de recuperación acompañados de niveles de detección bajos (Juan *et al.*, 2003). Los métodos analíticos para determinar los residuos en los alimentos deben ser capaces de medirlos a niveles muy bajos y proveer evidencia inequívoca para confirmar la identidad y cantidad de cualquier residuo detectado (Sannino *et al.*, 2004).

Para detectar un gran número de plaguicidas aplicados a los cultivos, se requiere el uso de técnicas de separación analítica como la cromatografía de gases (CG) y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) (Torres *et al.*, 1996). Ambas técnicas se han empleado con métodos de detección selectivos, en especial en CG con detectores como el de captura de electrones (Luke *et al.*, 1975) y de conductividad electrolítica para organoclorados y piretroides, el fotométrico de flama (Luke *et al.*, 1981) y el de nitrógeno fósforo para organofosforados (Cochrane y Greenhalgh, 1976). Ninguno de estos detectores son confirmatorios y todos ellos están sujetos a interferencias de matriz (Schachterle y Feigel, 1996). La espectrometría de masas (EM) no sólo sirve para detectar y cuantificar los diferentes compuestos, sino que también provee información definitiva para la identificación de éstos (Palmer, 2000). Hoy en día, organizaciones internacionales consideran que la

espectrometría de masas es el método de elección para la detección en el análisis de residuos y cada vez se desarrollan métodos cuantitativos con EM (Benfenati *et al.*, 2000).

Tradicionalmente, el monitoreo de plaguicidas en alimentos se ha llevado a cabo mediante métodos de cromatografía de gases, sin embargo, muchos de los nuevos plaguicidas son polares, térmicamente inestables, o de muy alto peso molecular (baja volatilidad), por lo que son más rápida y fácilmente analizables por métodos de cromatografía de líquidos (Sannino *et al.*, 2004). Los detectores utilizados en HPLC en el análisis de residuos de plaguicidas son: UV-visible que es universal pero poco selectivo ya que muchas moléculas absorben a la misma longitud de onda que los plaguicidas; el de fluorescencia que por el contrario es muy selectivo, pero muchos plaguicidas no son fluorescentes y se precisa de reacciones de derivatización y espectrometría de masas, cada día más popular (Juan *et al.*, 2003).

5. Literatura citada

- Anaya-Pérez, M. A. 2001. History of the use of *Opuntia* as forage in Mexico. *In: Cactus (Opuntia spp.) as forage*. FAO plant production and protection paper, 169. Rome, Italy. pp. 5-12.
- Badii, M. H. y E. A. Flores. 2001. Prickly pear cacti pests and their control in Mexico. *J Florida Entomol* 84(4):503-505.
- Ballantyne, B. y T. C. Marrs. 2004. Pesticides: an overview of fundamentals. *In: Pesticide toxicology and international regulation*. Marrs, T. C., and B. Ballantyne (ed). John Wiley & Sons. Chichester, England. pp 1-23.
- Benfenati, E., M. Natangelo y S. Tavazzi. 2000. Gas chromatography/mass spectrometry methods in pesticide analysis. *In: Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Meyers, R. A. (ed). John Wiley & Sons. Chichester, England. pp.
- Borrego E., F. y N. Burgos V. 1986. El nopal. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. 202 p.
- Cabras, P. 2003. Pesticides: toxicology and residues in food. *In: Food safety: contaminants and toxins*. D'Mello, J. P. F. (ed). CABI Publishing. Wallingford, UK. pp. 91-124.
- CICOPLAFEST (Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas). 2004. Catálogo de

- plaguicidas. CICOPLAFEST. SSA, SAGARPA, SEMARNAT, SE. México, D. F.
- Cochrane, W. P. y R. Greenhalgh. 1976. Evaluation and comparison of selective gas chromatographic detectors for the analysis of pesticide residues. *Chromatographia*. 9(6): 255-265.
- Cortinas N., C., A. C. Frias, C. Rodríguez T., R. Alatorre E. W., O. L. Loredó M., J. Castro D. y J. I. López O. 2000. Características de peligrosidad ambiental de plaguicidas-riesgos químicos ambientales. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT). México, D.F. 270 p.
- Coscolla, R. 1993. Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales. Mundi-Prensa. Madrid, España. 205 p.
- De la Rosa H., J. P. y D. Santana A. 1998. El nopal: Usos, manejo agronómico y costos de producción en México. UACH. CIESTAAM. Chapingo, México. 182 p.
- Evans J., A. Fernández B., A. Gavilán G., I. Ize L., M. A. Martínez C., P. Ramírez R. y M. Zuk. 2003. Introducción al análisis de riesgos ambientales. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT). México, D.F. 128 p.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2002. Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed. FAO. Rome, Italy. 192 p.
- Granados S., D. y A. D. Castañeda P. 1991. El nopal: historia, fisiología, genética e importancia frutícola. Trillas, México. 227 p.
- Guo, J. y X. Zhang. 2005. A new analysis method with GC or GC-MS for the quick detection of pesticide residues in vegetables. *J. Chromat Sci.* 43: 158-163.
- Hamilton, D. J., P. T. Holland, B. Ohlin, W. J. Murray, A. Ambrus, G. C. De Baptista, and J. Kovacicova. 1997. Optimum use of available residue data in the estimation of dietary intake of pesticides. *Pure & Appl Chem.* 69(6): 1373-1410.
- Harris, C. A. y A. R. C. Hill. 2004. Variability of residues in unprocessed food items and its impact on consumer risk assessment. *In: Pesticide toxicology and international regulation.* Marrs, T. C., and B. Ballantyne (ed). John Wiley & Sons. Chichester, England. pp 1-23.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). 2006. Comunicado Núm. 087/06. Resultados definitivos del II conteo de población y vivienda 2005. INEGI, Aguascalientes, Méx. 8 p.
- Juan, A., Y. Picó y G. Font. 2003. Revisión de los métodos de determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en alimentos. *Rev Toxicol.* 20:166-175.
- Longo, S. y C. Rapisarda. 1995. Pest of cactus pear. *In: Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear.* FAO Plant production and protection paper, 132. Rome, Italy. pp. 100-108.
- Luke, M. A., J. E. Froberg, and H. T. Masumoto 1975. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon

- pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *J Assoc Off Anal Chem.* 58(5):1020-1026.
- Luke, M. A., J. E. Froberg, G. M. Doose y H. T. Masumoto. 1981. Improved multiresidue gas chromatographic determination of organophosphorus, organonitrogen, and organohalogen pesticides in produce, using flame photometric and electrolytic conductivity detectors. *J Assoc Off Anal Chem.* 64(5):1187-1195.
- Mena C., J. y S. Rosas G. 2004. Guía para el manejo de integrado de las plagas del nopal tunero. SAGARPA, INIFAP. Calera, Zacatecas, México. 34 p.
- Muller, E. 2007. Establishment of maximum residue levels for minor uses. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin.* 37(1): 215–218.
- Palmer, P. T. 2000. Gas chromatography/mass spectrometry *In: Encyclopedia of Analytical Chemistry.* Meyers, R. A. (ed). John Wiley & Sons. Chichester, England. pp.
- Renwick, A. G. 2002. Pesticide residue analysis and its relationship to hazard characterisation (ADI/ARfD) and intake estimations (NEDI/NESTI). *Pest Manag Sci.* 58: 1073-1082.
- Sannino, A., L. Bolzoni, and M. Bandini. 2004. Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables. *J Chromatogr. A.* 1036(2): 161-169.
- Schachterle, S. y C. Feigel. 1996. Pesticide residue analysis in fresh produce by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 754: 411-422.
- SIAP-SIACON (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera-Sistema de información Agropecuaria de Consulta). 2006. Anuario estadístico de la producción agrícola 2005. SIAP-SIACON 1980-2006. SAGARPA. México. http://www.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp
- Skidmore, M. W., H. A. Kuiper y D. Hamilton. 1997. Safety evaluation of pesticide residues in food. *Chemistry International.* 19(4): 119-126.
- Torres, C.M., Y. Picó, J. Mañes. 1996. Determination of pesticide residues in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A.* 754(1-2): 301-331.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency). 1996. OPPTS 860.1500 Crop field trials. EPA 712-C-96-183. US EPA. Washington DC, USA. 89 p.
- WHO (World Health Organization). 1990. Principles for the toxicological assessment of pesticide residues in food. Environmental health criteria 104. WHO, Geneva, Switzerland. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc104.htm>
- WHO. 1997. Guidelines for predicting dietary intake of pesticides residues. GEMS/Food, World Health Organization, Geneva, Switzerland. 33 p.
- WHO. 1999. Principles for the assessment of risks to human health from exposure to chemicals. Environmental health criteria 210. World Health Organization. Geneva, Switzerland. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc210.htm>

CAPITULO I
LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS Y EVALUACIÓN DEL RIESGO
DIETÉTICO DE PLAGUICIDAS EN TUNA

1.1. RESUMEN

Se propusieron límites máximos de residuos (LMRs) de malatión, clorpirifos, permetrina, diazinon, dimetoato, spinosad y abamectina en tuna y se evaluó el riesgo dietético crónico. Para la evaluación de la exposición, se calcularon sus Ingestas Diarias Teóricas Máximas (IDTM) al utilizar el consumo *per cápita* de los alimentos y los LMRs de los cultivos en los que está autorizado cada plaguicida. La caracterización del riesgo consistió en comparar la IDTM con la ingesta diaria aceptable (IDA) de cada plaguicida. Cuando la IDTM de algún plaguicida excedió la IDA, se calculó la Ingesta Diaria Estimada (IDE) que consiste en utilizar datos de residuos monitoreados en lugar de los LMRs y también las IDEs se compararon con las IDAs. Los LMRs propuestos para tuna son 8.0, 1.0, 3.0, 0.5, 2.0, 0.3 y 0.1 mg kg⁻¹, respectivamente, para cada plaguicida, los cuales fueron los mismos que para otras frutas con cáscara no comestible; estos LMRs se utilizaron en la evaluación del riesgo. Las IDTMs de malatión, clorpirifos, permetrina, abamectina y spinosad no excedieron las IDAs. Para el caso de diazinón y dimetoato, las IDEs no excedieron sus respectivas IDAs. Estos LMRs pueden ser adoptados para tuna ya que no representan ningún riesgo para la salud por su consumo.

Palabras clave: ingesta diaria teórica máxima, ingesta diaria estimada, *Opuntia ficus-indica*, insecticidas, toxicología.

1.2. ABSTRACT

Chapter I. Maximum residue limits and dietary risk assessment of pesticides in prickly pear cactus fruit

Maximum residue limits (MRLs) of malathion, chlorpyrifos, permethrin, diazinon, dimethoate, spinosad and abamectin were proposed in prickly pear cactus fruit and the chronic dietary risk assessment was conducted. For the exposure assessment the theoretical maximum daily intakes (TMDI) were calculated using the Mexican MRLs and food consumption of crops for which each pesticide is registered. The risk characterization was carried out by comparing the TMDI with the acceptable daily intake (ADI). Furthermore, for the compounds with TMDI exceeding the ADI, the estimated daily intake (EDI) was calculated using monitoring residue data instead of MRLs, and also the EDIs were compared with the ADI. The proposed maximum residue limits for fruit are 8.0, 1.0, 3.0, 0.5, 2.0, 0.3 and 0.1 mg kg⁻¹, respectively for each pesticide, which were the same than for other fruits with peel inedible; these MRLs were used in the risk assessment. The TMDIs of malathion, chlorpyrifos permethrin, spinosad and abamectin did not exceed their ADIs. For diazinon and dimethoate the EDIs did not exceed their ADIs. These MRLs could be adopted for prickly pear cactus fruit because are unlikely to present a public health concern.

Keywords: theoretical maximum daily intake, estimated daily intake, *Opuntia ficus-indica*, insecticides, toxicology.

1.3. INTRODUCCIÓN

Debido al riesgo potencial de que ciertas cantidades de plaguicidas permanezcan como residuos sobre las frutas y hortalizas, cada país establece un Límite Máximo de Residuo (LMR) para cada plaguicida en los cultivos donde se ha autorizado su uso (Muller, 2007). Si este límite es excedido o si el plaguicida es utilizado en cultivos donde no se ha autorizado, la cosecha obtenida es considerada irregular y no debe comercializarse (Cabras, 2003). Con base en los resultados de la distribución de los residuos de plaguicidas (RdP) en varios estudios, la Comisión de la Comunidad Europea propone LMRs de acuerdo con las siguientes clases: 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 50, 100 y >100 mg kg⁻¹ (CEC, 1997). Aunque los LMRs no son un límite toxicológico, excederlos significa que los plaguicidas no se están utilizando correctamente y, comparando los valores de exposición con la IDA, el riesgo toxicológico al consumidor puede ser determinado (Cabras, 2003).

La mejor manera de garantizar que los RdP presentes en los alimentos están dentro de los límites seguros, es mediante estudios de ingesta de plaguicidas debida a los alimentos que forman parte de nuestra dieta e incluso el agua para beber (WHO, 1997). La predicción de la ingesta de RdP es vital para evaluar los LMRs propuestos y que éstos sean aceptados oficialmente para que los productos se puedan comercializar en el ámbito nacional e internacional (Hamilton *et al.*, 1997).

El principal objetivo de la evaluación de la toxicidad de los RdP, en la identificación y caracterización del peligro, es determinar un nivel sin efecto adverso observable (NOAEL: no-observed-adverse-effect-level) en animales, basado en la información toxicológica disponible la cual se utiliza en conjunto con factores de seguridad para determinar la ingesta diaria aceptable (IDA) para humanos (WHO, 1990). Para los plaguicidas de uso agrícola, los LMRs son derivados de ensayos en campo llevados a cabo de acuerdo con buenas prácticas agrícolas (BPA), el LMR no se basa en la IDA, lo que aparenta una desconexión entre los LMRs y las IDAs (Renwick, 2002). Sin embargo, en la

evaluación de riesgos, el paso de la caracterización del riesgo involucra la comparación de las ingestas potenciales debidas a los residuos presentes del plaguicida en los alimentos con la ingesta diaria aceptable (WHO, 1997).

Dado que para la población en general, la principal vía de exposición a los plaguicidas es a través de los residuos presentes en los alimentos, los objetivos fueron: proponer los LMRs de los plaguicidas malatión, diazinón, dimetoato, clorpirifos, permetrina, spinosad y abamectina en tuna; y evaluar el riesgo de exposición dietética a estos plaguicidas.

1.4. MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1. Establecimiento de LMRs

El establecimiento de los LMRs de los plaguicidas propuestos se basó en los siguientes pasos: 1) Se obtuvieron las IDAs de publicaciones científicas; 2) del catálogo oficial de plaguicidas (CICOPLAFEST, 2004) se obtuvieron los cultivos en los cuales los plaguicidas están registrados para su uso en México con sus respectivos LMRs; 3) para proponer los LMRs se tomó como criterio que tipo de alimento representa, es decir, la tuna es una fruta y además presenta cáscara, por lo que los LMRs fueron los mismos que para otras frutas similares, por ejemplo los cítricos; 4) se estimaron los niveles de exposición dietética; (5) finalmente, los niveles de exposición se compararon con las IDAs.

1.4.2. Evaluación del riesgo

1.4.2.1. Caracterización de la peligrosidad (Toxicología)

Datos toxicológicos de malatión, diazinón, dimetoato, clorpirifos, permetrina, spinosad y abamectina se utilizaron para calcular el potencial de riesgo a la salud humana. Los datos incluyeron la Ingesta Diaria Aceptable (IDA), el Nivel Sin Efecto Adverso Observado (NOAEL, por sus siglas en inglés), la Dosis Letal Media (DL₅₀) y la Clasificación Toxicológica de los plaguicidas de acuerdo con su peligrosidad según la Organización Mundial de la Salud (OMS).

1.4.2.2. Evaluación de la exposición y caracterización del riesgo

En la estimación de ingesta de plaguicidas se utilizan valores de consumo de alimentos. El consumo *per cápita* diario de los alimentos se obtuvo de las hojas de balance alimenticio para México de la FAO [Food and Agriculture Organization]. Cuando los datos alimenticios no estaban disponibles para un cultivo, los consumos *per cápita* se calcularon al dividir la producción nacional de determinado producto agrícola entre la población de México según el INEGI (2006). Los datos de tuna se incluyeron en la evaluación de la exposición y se usaron los LMRs propuestos para su cálculo.

Los niveles de exposición a los plaguicidas se estimaron con base en los métodos de Ingesta Diaria Teórica Máxima (IDTM) e Ingesta Diaria Estimada (IDE) utilizados por la OMS (WHO, 1997). El método de la IDTM consiste en multiplicar los LMRs, establecidos para los cultivos en los que está autorizado el plaguicida, por la media del consumo *per cápita* diario (kg) de los alimentos.

En la caracterización del riesgo, cuando la IDTM de algún plaguicida excedió la IDA, se calculó la Ingesta Diaria Estimada nacional. La IDE representa una predicción más real de esa ingesta, ya que se utilizan la mediana o la media de los residuos de plaguicidas encontrados en ensayos supervisados (STMR, supervised trials median residues) en lugar de los LMRs.

1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.5.1. Límites Máximos de Residuos propuestos

Los LMRs propuestos para tuna se muestran en el Cuadro 2. Hasta finales de 2004, el establecimiento de LMRs de plaguicidas en productos agrícolas en México se basaba en la Norma Oficial Mexicana NOM-050-FITO-1995 (DOF, 1995). El 14 de octubre de 2004, se publicó en el Diario Oficial de la Federación (DOF), la cancelación de la NOM-050-FITO-1995, debido a que existen lineamientos adoptados por los países miembros del Tratado de Libre

Comercio de América del Norte (TLCAN), que sustituirán y armonizarán esta regulación (DOF, 2004a).

Cuadro 2. Límites máximos de residuos (LMR) propuestos de los plaguicidas en tuna.

Plaguicida	LMR propuesto (mg kg ⁻¹)
Malatión	8
Clorpirifos	1
Permetrina	3
Diazinón	0.5
Dimetoato	2
Abamectina	0.1
Spinosad	0.3

El 28 de diciembre de 2004, se publicó en el DOF el Reglamento en Materia de Registros, Autorizaciones de Importación y Exportación y Certificados de Exportación de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y Sustancias y Materiales Tóxicos o Peligrosos (DOF, 2004b). En el que se señala que para el registro de plaguicidas que requieren LMRs, éstos deberán determinarse conforme a los lineamientos establecidos en la NOM que corresponda y en tanto se expide esta NOM, se podrán aceptar los LMRs siguiendo los lineamientos de la US EPA (United States Environmental Protection Agency), del *Codex Alimentarius* o en su defecto, de la Unión Europea o cualquier país que forma parte de ésta, siempre y cuando sea el país de mayor importación de los productos agrícolas. México también acepta el registro de plaguicidas de acuerdo con los lineamientos de Canadá.

De hecho, los LMRs para México son más altos que los del *Codex alimentarius* y de la Unión Europea, pero son similares a los establecidos en EUA y Canadá. Sin embargo, hay una tendencia para la armonización de LMRs Muller, 2007.

1.5.2. Evaluación del riesgo

1.5.2.1. Caracterización de la peligrosidad (Toxicología)

En el Cuadro 3, se muestra la información toxicológica de los plaguicidas sobre mamíferos. Desde 1975, la OMS publica periódicamente una guía de clasificación de plaguicidas según su peligrosidad en cuanto a toxicidad aguda (WHO, 2005); esta clasificación se basa en la DL₅₀ oral y dermal de los ingredientes activos (i.a.) y considera el porcentaje de i.a. presente en la formulación, además del estado físico (sólido o líquido). De acuerdo con la clasificación de la OMS, sólo se propusieron plaguicidas ligeramente y moderadamente tóxicos.

Cuadro 3. Información toxicológica de los plaguicidas sobre mamíferos.

Insecticida	DL ₅₀ oral [†] mg kg ⁻¹ de PC (ratas)	NOAEL mg kg ⁻¹ PC día ⁻¹ (ratas)	IDA mg kg ⁻¹ PC día ⁻¹	Clasificación Toxicológica OMS [†]
Malatión	2100	29 [¶]	0.300 [¶]	Ligeramente tóxico
Diazinón	1000	0.5 [§]	0.005 [§]	Moderadamente tóxico
Dimetoato	150	1.2 ^b	0.002 ^b	Moderadamente tóxico
Clorpirifos	135	1 [□]	0.010 [□]	Moderadamente tóxico
Permetrina	500	5 [□]	0.050 [□]	Moderadamente tóxico
Abamectina	10 ^{b^p}	0.25 [¶]	0.002 [¶]	Sin clasificar
Spinosad	3738	2.4 ^{††}	0.02 ^{††}	Improbable que sea tóxico

PC: Peso corporal, IDA: Ingesta Diaria Aceptable, [†]WHO (2005), [¶]FAO-WHO (1998), [§]FAO-WHO (2006), ^bFAO-WHO (2004a), [□]FAO-WHO (1999), ^{††}FAO-WHO (2002), ^{b^p}Tomlin (2000)

La OMS clasifica a los plaguicidas en 5 categorías: [Ia] Extremadamente tóxico (o peligroso), [Ib] Altamente tóxico, [II] Moderadamente tóxico, [III] Ligeramente tóxico y [U] poco probable que presente un peligro en cuanto a toxicidad aguda en condiciones de uso normal y tomando en cuenta que deben tener una DL₅₀ oral mayor de 2000 mg kg⁻¹ para sólidos (spinosad) y 3000 mg kg⁻¹ para líquidos (glifosato) (WHO, 2005). En México, las categorías III y U están agrupadas en la categoría ligeramente tóxico. Abamectina no aparece en la clasificación de la OMS, pero en México, las presentaciones comerciales de 1.8% de i.a. están clasificadas como moderadamente tóxico.

Generalmente, la IDA se obtiene al extrapolar el NOAEL (máximo nivel de exposición probado al cual no se observan efectos tóxicos), obtenido en animales en laboratorio, a los humanos; para su cálculo, se divide el NOAEL entre 100 que es la cifra que normalmente se toma como factor de seguridad, ya que se considera que el hombre puede ser 10 veces más sensible que los animales experimentales y además, se toma un factor de 10 por la diversidad de sensibilidad entre la población humana (WHO, 1999; Cabras, 2003). El panel de la JMPR decidió usar un factor de seguridad de 500 para dimetoato debido a la posibilidad de que a dosis de 1.2 mg kg⁻¹ de peso corporal al día puede afectar el funcionamiento reproductivo de ratas (FAO-WHO, 2004a).

1.5.2.2. Evaluación de la exposición y caracterización del riesgo

La FAO toma en consideración los volúmenes de producción, exportación e importación de cada producto en cada país para el cálculo de los patrones de consumo de alimentos en las hojas de balance alimenticio y aunque están sujetas a muchas incertidumbres y limitaciones, representan la mejor fuente de datos disponibles para comparaciones internacionales y son adecuados para la predicción de la ingesta de residuos de plaguicidas (WHO, 1997). En el Cuadro 4 aparece el cálculo del consumo *per cápita* de los alimentos que no se especifican en las hojas de balance alimenticio de la FAO.

Cuadro 4. Cálculo del consumo *per cápita* de los alimentos que no se detallan en las hojas de balance alimenticio para México de la FAO.

Producto	Producción 2005		Consumo <i>per cápita</i>		
	ton	kg	kg/año	kg/día	g/día
Apio	19,149.80	19,149,800	0.1854	0.0005	0.51
Betabel	18,853.81	18,853,810	0.1826	0.0005	0.50
Chabacano	1,297.90	1,297,900	0.0126	0.0000	0.03
Chayote	109,002.00	109,002,000	1.0556	0.0029	2.89
Okra	18,940.15	18,940,150	0.1834	0.0005	0.50
Rábano	26,991.84	26,991,840	0.2614	0.0007	0.72
Tomate de cáscara	553,868.87	553,868,870	5.3637	0.0147	14.69
Tuna	366,383.75	366,383,750	3.5481	0.0097	9.72

Población de México en 2005: 103,263,388; Fuente: censo de población y vivienda 2005 (INEGI, 2006). Producción: SIACON, 2006.

Las IDTMs de malatión, clorpirifos, permetrina, abamectina y spinosad, a través de la dieta de los mexicanos, no excedieron sus respectivas IDAs (Cuadros 5, 6, y 7).

Cuadro 5. Ingesta Diaria Teórica Máxima (IDTM) de malatión en México.

Producto	Dieta [¶]	LMR [†]	IDTM	Producto	Dieta [¶]	LMR [†]	IDTM
	g día ⁻¹	mg kg ⁻¹	mg día ⁻¹		g día ⁻¹	mg kg ⁻¹	mg día ⁻¹
Acelga	0.20	8	0.0016	Manzana	16.77	8	0.1342
Aguacate	19.12	8	0.1530	Melón	10.49	8	0.0839
Ajo	1.11	8	0.0089	Nuez	2.37	8	0.0190
Apio	0.51	8	0.0041	Okra	0.5	8	0.0040
Arroz	22.88	8	0.1830	Papa	47.18	8	0.3774
Avena	0.29	8	0.0023	Papaya	21.48	1	0.0215
Berenjena	0.06	8	0.0005	Pepino	0.15	8	0.0012
Cacahuete	6.88	8	0.0550	Pera y membrillo	2.93	8	0.0234
Calabaza	9.46	8	0.0757	Piña	17.28	8	0.1382
Cebada	12.72	8	0.1018	Rábano	0.72	8	0.0057
Cebolla	23.98	8	0.1918	Sandía	13.18	8	0.1054
Chabacano	0.2	8	0.0016	Soya	55.27	8	0.4422
Chícharo	0.98	8	0.0078	Tomate (jitomate)	36.68	8	0.2934
Chile	34.27	8	0.2742	Tomate de cascara	14.69	8	0.1176
Ciruela	3.13	8	0.0250	Trigo	84.24	8	0.6739
Cítricos	139.63	8	1.1170	Uva	7.51	8	0.0601
Coles	2.82	8	0.0226	Zanahoria y nabos	8.6	8	0.0688
Coliflor y brócoli	5.17	8	0.0414	Carne de aves	76.72	4	0.3069
Durazno y nectarino	5.7	8	0.0456	Carne de bovino	30.24	4	0.1210
Esparrago	0.58	8	0.0046	Carne de cerdo	36.61	4	0.1464
Espinaca	0.28	8	0.0022	Carne de conejo	0.11	4	0.0004
Fresa	3.1	8	0.0248	Carne de equino	2.21	4	0.0088
Frijoles	30.21	8	0.2417	Huevo	44.56	0.1	0.0045
Guayaba y mango	29.9	8	0.2392	Agua	1500	0.19	0.2850
Lechuga	6.47	8	0.0518	Tuna	9.72	8	0.0778
Maíz	326.71	8	2.6137				
						Total	9.0116
						IDA (mg kg ⁻¹ de PC)	0.3
						IDA (mg por persona 60 kg)	18
						% IDA	50.1

[†]CICOPPLAFEST (2004); [¶]FAO (2007).

En residuos de plaguicidas en alimentos reportados por la FAO y la OMS, los residuos de malatión, clorpirifos (FAO-WHO, 2004b), spinosad (FAO-WHO, 2002) y permetrina (FAO-WHO, 1999), como resultado de su uso, no representaron riesgos para la salud humana. En situaciones donde el nivel de exposición tiene un amplio margen de seguridad, los LMRs propuestos de estos plaguicidas para tuna pueden ser aceptados porque no representan ningún

riesgo a la salud cuando se usan bajo un programa de buenas prácticas agrícolas (Renwick, 2002).

Cuadro 6. Ingesta Diaria Teórica Máxima (IDTM) de clorpirifos y permetrina en México.

Producto	Dieta [¶] g día ⁻¹	Clorpirifos		Permetrina	
		LMR [†] mg kg ⁻¹	IDTM mg día ⁻¹	LMR [†] mg kg ⁻¹	IDTM mg día ⁻¹
Aguacate	19.12	nr	-	1	0.0191
Apio	0.51	nr	-	5	0.0025
Arroz	22.88	0.1	0.0023	nr	-
Berenjena	0.06	nr	-	1	0.0001
Calabaza	9.46	nr	-	3	0.0284
Caña de azúcar	3.5	0.1	0.0004	nr	-
Chile	34.27	1	0.0343	1	0.0343
Cítricos	139.63	1	0.1396	nr	-
Coles	2.82	nr	-	6	0.0169
Coliflor y brócoli	5.17	nr	-	1	0.0052
Duraznos y nectarinos	5.70	nr	-	5	0.0285
Ejotes	2.9	0.05	0.0001	nr	-
Esparrago	0.58	nr	-	1	0.0006
Espinaca	0.28	nr	-	20	0.0056
Lechuga	6.47	nr	-	20	0.1294
Maíz	326.71	0.05	0.0163	0.05	0.0163
Manzana	16.77	1.5	0.0252	0.05	0.0008
Melón	10.49	nr	-	3	0.0315
Papa	47.18	nr	-	0.05	0.0024
Pepino	0.15	0.05	0.0000	3	0.0005
Pera y membrillo	2.93	nr	-	3	0.0088
Sandía	13.18	nr	-	3	0.0395
Soya	55.27	0.3	0.0166	0.05	0.0028
Tomate (jitomate)	36.68	0.5	0.0183	2	0.0734
Tomate de cascara	14.69	nr	-	2	0.0294
Trigo	84.24	0.5	0.0421	nr	-
Carne de aves	76.72	0.5	0.0384	0.1	0.0077
Carne de bovino	30.24	0.5	0.0151	0.05	0.0015
Carne de cerdo	36.61	0.5	0.0183	0.25	0.0092
Carne de conejo	0.11	1	0.0001	0.25	0.0000
Carne de equino	2.21	0.5	0.0011	0.25	0.0006
Agua	1500	0.09	0.1350	nr	-
Tuna	9.72	1	0.0097	3	0.0292
Total			0.5129		0.5239
IDA (mg kg ⁻¹ de PC)			0.01		0.05
IDA (mg por persona 60 kg)			0.6		3
% IDA			85.49		17.46

[†]CICOPLAFEST (2004); [¶]FAO (2007); nr= no registrado.

Cuadro 7. Ingesta Diaria Teórica Máxima (IDTM) de spinosad y abamectina en México.

Producto	Dieta [¶] g día ⁻¹	Spinosad		Abamectina	
		LMR [†] mg kg ⁻¹	IDTM mg día ⁻¹	LMR [†] mg kg ⁻¹	IDTM mg día ⁻¹
Aguacate	19.12	0.3	0.0057	0.05	0.0010
Apio	0.51	nr	-	0.05	0.0000
Berenjena	0.06	0.4	0.0000	nr	-
Calabaza	9.46	0.3	0.0028	0.005	0.0000
Chayote	2.89	nr	-	0.005	0.0000
Chile	34.27	0.4	0.0137	0.02	0.0007
Cítricos	139.63	0.3	0.0419	0.1	0.0140
Coles	2.82	2	0.0056	nr	-
Coliflor y brócoli	5.17	2	0.0103	nr	-
Fresa	3.10	nr	-	0.02	0.0001
Guayaba y mango	29.90	0.3	0.0090	nr	-
Lechuga	6.47	8	0.0518	nr	-
Manzana	16.77	2	0.0335	0.02	0.0003
Melón	10.49	0.3	0.0031	0.005	0.0001
Nuez	2.37	2	0.0047	nr	-
Papa	47.18	nr	-	0.005	0.0002
Pepino	0.15	0.3	0.0000	0.005	0.0000
Pera y membrillo	2.93	2	0.0059	0.02	0.0001
Sandía	13.18	0.3	0.0040	0.005	0.0001
Tomate (jitomate)	36.68	0.4	0.0147	0.01	0.0004
Tomate de cascara	14.69	nr	-	0.01	0.0001
Tuna	9.72	0.3	0.0029	0.1	0.0010
Total			0.2098		0.0180
IDA (mg kg ⁻¹ de PC)			0.02		0.002
IDA (mg por persona 60 kg)			1.2		0.12
% IDA			17.48		14.99

[†]CICOPLAFEST (2004); [¶]FAO (2007); nr= no registrado.

La IDTM nacional de diazinón excedió la IDA casi al doble (Cuadro 8). En el ámbito internacional, en 1999, la FAO y la OMS encontraron que los residuos de diazinón pueden exceder las IDAs de las dietas del Medio Oriente y Europa (FAO-WHO, 1999). Caldas y Souza (2000) estimaron que la IDTM de diazinón representó 330% de la IDA, en Brasil. De manera contrastante, Caldas y Souza (2004) obtienen que la IDTM de diazinón en Brasil fue menor que la IDA. Chun y Kang (2003) reportan que la IDTM de diazinón representó 86.7% de la IDA en Corea.

Cuadro 8. Ingesta Diaria Teórica Máxima (IDTM) e Ingesta Diaria Estimada (IDE) de diazinón y dimetoato en México.

Producto	Dieta [†] g día ⁻¹	Diazinón				Dimetoato			
		LMR [†] mg kg ⁻¹	IDTM mg día ⁻¹	STMR [§] mg kg ⁻¹	IDE mg día ⁻¹	LMR [†] mg kg ⁻¹	IDTM mg día ⁻¹	STMR [§] mg kg ⁻¹	IDE mg día ⁻¹
Aceituna	3.54	1	0.0035	sd	0.0035	nr	-	-	-
Ajo	1.11	0.75	0.0008	0.0075	0.0000	2	0.0022	sd	0.0022
Apio	0.51	0.7	0.0004	0.1525	0.0001	2	0.0010	0.0110	0.0000
Avena	0.29	nr	-	-	-	1	0.0003	sd	0.0003
Cacahuate	6.88	0.75	0.0052	sd	0.0052	nr	-	-	-
Café	3.88	0.2	0.0008	0.2	0.0008	nr	-	-	-
Calabaza	9.46	0.5	0.0047	0.0438	0.0004	nr	-	-	-
Caña de azúcar	3.5	0.75	0.0026	sd	0.0026	nr	-	-	-
Cebada	12.72	nr	-	-	-	0.3	0.0038	0.1500	0.0019
Cebolla	23.98	0.75	0.0180	0.0015	0.0000	nr	-	-	-
Chicharo	0.98	0.5	0.0005	sd	0.0005	2	0.0020	0.0060	0.0000
Chile	34.27	0.5	0.0171	0.128	0.0044	2	0.0685	0.0230	0.0008
Ciruela	3.13	0.5	0.0016	0.0015	0.0000	nr	-	-	-
Cítricos	139.63	0.7	0.0977	0.0815	0.0114	2	0.2793	0.0360	0.0050
Coles	2.82	0.7	0.0020	0.01	0.0000	2	0.0056	0.0120	0.0000
Coliflor y brócoli	5.17	0.7	0.0036	0.028	0.0001	2	0.0103	0.0250	0.0001
Duraznos y nectarinos	5.70	0.7	0.0040	0.0543	0.0003	nr	-	-	-
Ejotes	2.9	0.5	0.0015	sd	0.0015	2	0.0058	0.2800	0.0008
Espinaca	0.28	0.7	0.0002	0.2265	0.0001	2	0.0006	0.0240	0.0000
Fresa	3.10	0.5	0.0016	0.0165	0.0001	nr	-	-	-
Frijoles	30.21	0.5	0.0151	sd	0.0151	2	0.0604	0.0060	0.0002
Higo	0.28	0.5	0.0001	0.28	0.0001	nr	-	-	-
Lechuga	6.47	0.7	0.0045	0.0825	0.0005	2	0.0129	0.3000	0.0019
Maíz	326.71	0.7	0.2287	0.027	0.0088	0.1	0.0327	0.0100	0.0033
Manzana	16.77	0.5	0.0084	0.04	0.0007	2	0.0335	0.0060	0.0001
Melón	10.49	0.75	0.0079	0.005	0.0001	1	0.0105	0.0100	0.0001
Nabo	0.06	nr	-	-	-	2	0.0001	0.0050	0.0000
Nuez	2.37	0.5	0.0012	sd	0.0012	0.1	0.0002	sd	0.0002
Papa	47.18	0.1	0.0047	0.023	0.0011	0.2	0.0094	0.0010	0.0000
Pepino	0.15	0.75	0.0001	0.088	0.0000	nr	-	-	-
Pera y membrillo	2.93	0.5	0.0015	0.04	0.0001	2	0.0059	0.0080	0.0000
Piña	17.28	0.5	0.0086	0.0465	0.0008	nr	-	-	-
Plátano	45.52	0.2	0.0091	0.028	0.0013	nr	-	-	-
Rábano	0.72	0.5	0.0004	0.038	0.0000	nr	-	-	-
Sandía	13.18	0.75	0.0099	0.002	0.0000	1	0.0132	0.0060	0.0001
Soya	55.27	0.1	0.0055	sd	0.0055	0.05	0.0028	0.0500	0.0028
Tomate (jitomate)	36.68	0.75	0.0275	0.12	0.0044	2	0.0734	0.0060	0.0002
Tomate de cascara	14.69	0.75	0.0110	sd	0.0110	1	0.0147	sd	0.0147
Trigo	84.24	0.05	0.0042	sd	0.0042	0.04	0.0034	0.0400	0.0034
Uva	7.51	0.75	0.0056	0.0775	0.0006	1	0.0075	1.0000	0.0075
Carne de aves	76.72	0.02	0.0015	0.0050	0.0004	nr	-	-	-
Carne de bovino	30.24	0.02	0.0006	0.0050	0.0002	nr	-	-	-
Carne de cerdo	36.61	0.02	0.0007	0.0050	0.0002	nr	-	-	-
Carne de conejo	0.11	0.7	0.0001	0.0350	0.0000	nr	-	-	-
Carne de equino	2.21	0.02	0.0000	0.0050	0.0000	nr	-	-	-
Huevo	44.56	nr	-	-	-	nr	-	-	-
Miel	0.83	0.5	0.0004	0.0009	0.0000	nr	-	-	-
Agua para beber	1500	0.02	0.0300	0.0001	0.0002	0.02	0.0300	0.0024	0.0036
Tuna	9.72	0.5	0.0049	sd	0.0049	2	0.0194	sd	0.0194
Total			0.5581		0.0922		0.7095		0.0688
IDA (mg kg ⁻¹ de PC)			0.005		0.005		0.002		0.002
IDA (mg por persona 60 kg)			0.3		0.3		0.12		0.12
% IDA			186.03		30.75		591.24		57.34

[†]CICOPLAFEST (2004); [‡]FAO (2007); [§]USA EPA (2000) y USA EPA (2004); ^bUSA EPA (1998); nr= no registrado; STMR: (Supervised Trial Median Residues) mediana o media de los residuos de plaguicidas encontrados en ensayos supervisados.

Los residuos de dimetoato excedieron la IDA más de 5.9 veces (Cuadro 8). En 2003, la ingesta de dimetoato excedió la IDA en la dieta Europea (FAO-WHO, 2004a). En Brasil, Caldas y Souza (2000) y Caldas y Souza (2004) también encontraron que la IDTM de dimetoato excedió la IDA. Asimismo, Chun y Kang (2003) obtuvieron que la IDTM de dimetoato en Corea constituyó 438% de la IDA.

La IDTM es una sobreestimación de la ingesta real de residuos de plaguicidas ya que, entre otras cosas: la mayoría de los cultivos tratados contienen residuos mucho más bajos que el LMR al momento de la cosecha; además, no en todas las regiones donde se establece un cultivo son tratadas con el mismo plaguicidas, y se considera el porcentaje comestible de los alimentos (por ejemplo, aquellos que tienen cáscara), reducción (o concentración) del residuo durante el almacenamiento y manipulación del alimento (lavado), reducción (o concentración) del residuo durante el cocinado o preparación, entre otros (WHO, 1997).

Según la WHO (1997), no se debe concluir que los LMRs de diazinón y dimetoato son inaceptables debido a que las IDTMs excedieron las IDAs. De acuerdo con Hamilton *et al.* (1997), la ingesta de plaguicidas en la dieta debe calcularse utilizando datos reales, es decir, con el método de la Ingesta Diaria Estimada, en lugar de la IDTM. En este sentido, en el Cuadro 8 se muestra el cálculo de las IDEs de diazinón y dimetoato, las cuales no excedieron las IDAs.

1.6. CONCLUSIONES

Los límites máximos de residuos (LMRs) propuestos de malatión, clorpirifos, permetrina, diazinon, dimetoato, spinosad y abamectina para tuna son de 8.0, 1.0, 3.0, 0.5, 1.0, 0.3 y 0.1 mg kg⁻¹, respectivamente. Los valores de predicción de las Ingestas Teóricas Diarias Máximas Nacionales de malatión, clorpirifos, permetrina, spinosad y abamectina no excedieron sus Ingestas Diarias Aceptables (IDAs). Las Ingestas Diarias Estimadas de diazinón y dimetoato no excedieron sus IDAs. Estos LMRs pueden ser adoptados para

tuna, ya que no representan ningún riesgo para la salud de los mexicanos por su ingesta a través de los alimentos.

1.7. LITERATURA CITADA

- Cabras, P. 2003. Pesticides: toxicology and residues in food. *In: Food safety: contaminants and toxins*. D'Mello, J. P. F. (ed). CABI Publishing. Wallingford, UK. pp. 91-124.
- Caldas, E. D. and Souza, L. C. K. R. 2000. Chronic dietary risk assessment of pesticide residues in Brazilian food. *Journal of Public Health*. 34(5): 529-537.
- Caldas, E. D. and Souza, L. C. K. R. 2004. Chronic dietary risk for pesticide residues in food in Brazil: an update. *Food Additives and Contaminants*. 21(11): 1057-1064.
- CEC (Commission of the European Communities). 1997. Calculation of maximum residue levels and safety intervals. CEC. Directorate General for Agriculture VI BII-1, 7039/VI/95 EN (1997). 13 p. [En línea] http://europa.en.int/comm/food/fs/ph_ps/pest/calculation.pdf Última consulta: 30 de junio de 2008.
- Chun, O. K. y H. G. Kang. 2003. Estimation of risks of pesticide exposure, by food intake, to Koreans. *Food and Chemical Toxicology*. 41(8): 1063-1076.
- CICOPLAFEST (Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas). 2004. Catálogo de plaguicidas. CICOPLAFEST. SSA, SAGARPA, SEMARNAT, SE. México, D. F.
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 1996. NORMA Oficial Mexicana NOM-050-FITO-1995, por la que se establecen los requisitos y especificaciones fitosanitarias para efectuar ensayos de campo para el establecimiento de límites máximos de residuos de plaguicidas en productos agrícolas. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Diario Oficial de la Federación. México, D.F. 11 p.
- DOF. 2004a. CANCELACION de la Norma Oficial Mexicana NOM-050-FITO-1995. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, D.F. 1 p.
- DOF. 2004b. Reglamento en Materia de Registros, Autorizaciones de Importación y Exportación y Certificados de Exportación de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y Sustancias y Materiales Tóxicos o Peligrosos. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, D.F. 30 p.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 1986. Guidelines on pesticide residue trials to provide data for the registration of pesticides and the establishment of maximum residue limits. FAO. Rome, Italy. 1986. 36 p.

- FAO. 2007. FAOSTAT, FAO Dirección de Estadística 2007: Food Balance Sheets data, Mexico 2005. [En línea] <http://faostat.fao.org/site/368/default.aspx> Última consulta: 15 de agosto de 2007.
- FAO-WHO (Food and Agriculture Organization-World Health Organization). 1998. Pesticide residues in food -1997. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group. FAO plant production and protection paper, 145. Rome, Italy. 250 p.
- FAO-WHO. 1999. Pesticide residues in food -1999. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group. FAO plant production and protection paper, 153. Rome, Italy. 293 p.
- FAO-WHO. 2002. Pesticide residues in food -2001. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group. FAO plant production and protection paper, 171. Rome, Italy. 293 p.
- FAO-WHO. 2004a. Pesticide residues in food-2003. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group. FAO plant production and protection paper, 176. Rome, Italy. 303 p.
- FAO-WHO. 2004b. Pesticide residues in food-2004. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group. FAO plant production and protection paper, 178. Rome, Italy. 375 p.
- FAO-WHO. 2006. Pesticide residues in food -2006. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group. FAO plant production and protection paper, 187. Rome, Italy. 385 p.
- Hamilton, D. J., P. T. Holland, B. Ohlin, W. J. Murray, A. Ambrus, G. C. De Baptista, and J. Kovacicova. 1997. Optimum use of available residue data in the estimation of dietary intake of pesticides. *Pure & Appl Chem.* 69(6): 1373-1410.
- Harris, C. A. y A. R. C. Hill. 2004. Variability of residues in unprocessed food items and its impact on consumer risk assessment. *In: Pesticide toxicology and international regulation.* Marrs, T. C., and B. Ballantyne (ed). John Wiley & Sons. Chichester, England. pp 1-23.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). 2006. Comunicado Núm. 087/06. Resultados definitivos del II conteo de población y vivienda 2005. INEGI. Aguascalientes, Méx. 8 p.
- Muller, E. 2007. Establishment of maximum residue levels for minor uses. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin.* 37(1): 215-218.
- Renwick, A. G. 2002. Pesticide residue analysis and its relationship to hazard characterisation (ADI/ARfD) and intake estimations (NEDI/NESTI). *Pest Manag Sci.* 58: 1073-1082.

- Sannino, A., L. Bolzoni, and M. Bandini. 2004. Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables. *J Chromatogr. A*. 1036(2): 161-169.
- SIAP-SIACON (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera-Sistema de información Agropecuaria de Consulta). 2006. Anuario estadístico de la producción agrícola 2005. SIAP-SIACON 1980-2006. SAGARPA. México. [En línea]: http://www.siap.gob.mx/agricola_siap/icultivo/index.jsp Última consulta: 16 de agosto de 2007.
- Tomlin C. D. S. 2000. The e-pesticide manual, a world compendium of pesticides. 12th edition. British Crop Protection Council. Surrey, UK. CD-ROM.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency). 1998. Dietary exposure analysis for dimethoate in support of the reregistration eligibility decision. United States Environmental Protection Agency. Washington DC, USA. 39 p.
- US EPA. 2000. Diazinon (057801): Refined anticipated residues/acute and chronic dietary risk assessment (including beef fat). DP Barcode D269781. United States Environmental Protection Agency. Washington DC, USA. 22 p.
- US EPA. 2004. Interim reregistration eligibility decision for diazinon. EPA 738-R-04-006. United States Environmental Protection Agency. Washington DC, USA. 112 p.
- US EPA. 2006. Interim reregistration eligibility decision for dimethoate. United States Environmental Protection Agency. Washington DC, USA. 63 p.
- WHO (World Health Organization). 1990. Principles for the toxicological assessment of pesticide residues in food. Environmental health criteria 104. WHO, Geneva, Switzerland. [En línea] <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc104.htm> Última consulta: 30 de junio de 2008.
- WHO. 1997. Guidelines for predicting dietary intake of pesticides residues. GEMS/Food, World Health Organization, Geneva, Switzerland. 33 p.
- WHO. 1999. Principles for the assessment of risks to human health from exposure to chemicals. Environmental health criteria 210. World Health Organization. Geneva, Switzerland. [En línea] <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc210.htm> Última consulta: 30 de junio de 2008.
- WHO. 2005. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2004. International Programme on Chemical Safety and the World Health Organization. Geneva, Switzerland. 56 p.

CAPITULO II

DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN TUNA POR CROMATOGRFÍA DE GASES Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS

2.1. RESUMEN

Se validó la determinación multiresiduos de los insecticidas malatión, clorpirifos, permetrina, diazinon y dimetoato en tuna, la cual se llevó a cabo por cromatografía de gases y espectrometría de masas. Los residuos se extrajeron con el método multiresiduos de Luke con algunas modificaciones; este método emplea extracción con acetona y partición con éter de petróleo y diclorometano. A muestras blanco se les adicionaron los plaguicidas a 0.1 mg kg⁻¹. Los porcentajes de recuperación variaron de 85.8 a 93.7% con un coeficiente de variación menor a 11%. El límite de cuantificación del método fue ≤ 0.08 mg kg⁻¹. Los resultados obtenidos muestran que el método es eficiente para la determinación simultánea de estos plaguicidas a niveles de residuos bajos.

Palabras clave: insecticidas, extracción por partición, plaguicidas agrícolas, método de Luke, *Opuntia ficus-indica*.

2.2. ABSTRACT

Chapter II. Determination of pesticide residues in prickly pear cactus fruit by gas chromatography and mass spectrometry

The multiresidue determination of the insecticides malathion, chlorpyrifos, permethrin, diazinon and dimethoate in prickly pear cactus fruit was validated, which has been carried out by gas chromatography and mass spectrometry. Pesticides from cactus pear fruit were extracted using the Luke method, with some modifications; this method uses extraction with acetone and partition with petroleum ether and methylene chloride. Blank samples were spiked to 0.1 mg kg^{-1} with each pesticide. The average recoveries varied from 85.8 to 93.7% with a relative standard deviation $<11\%$. The detection limit of the method was 0.08 mg kg^{-1} or less. The obtained results showed that the method is reproducible and sensitive enough for the simultaneous determination of these insecticides in prickly pear cactus fruit at low residue levels.

Keywords: insecticides, partition extraction, agricultural pesticides, Luke method, *Opuntia ficus-indica*.

2.3. INTRODUCCIÓN

La agricultura intensiva implica el uso de grandes cantidades de plaguicidas en muchos cultivos (Guo y Zhang, 2005). En varios países existen programas de monitoreo de residuos de plaguicidas (RdP) que mantienen un estricto control de vigilancia tanto sobre los alimentos locales como los importados con la finalidad de proteger la salud de los consumidores (Anastassiades *et al*, 2003). Los métodos multiresiduos son los que las agencias gubernamentales comúnmente usan para inspeccionar, monitorear y determinar cuáles plaguicidas y en qué cantidad están presentes en los alimentos (Seiber, 1999). Los cambios en los métodos multiresiduos de análisis de RdP han sido significantes al paso de los años y estos cambios están relacionados al desarrollo de los instrumentos de determinación (US FDA, 1999).

Uno de los primeros métodos multiresiduos fue publicado por Mills (1959) quién utilizó cromatografía en papel para la estimación semicuantitativa de plaguicidas organoclorados (OCs). Con el desarrollo de la cromatografía de gases (CG), que permite mediciones más precisas, Mills *et al.* (1963) utilizaron la CG con detección micro-colorimétrica para la determinación de OCs. Ante la aparición de los plaguicidas organofosforados (OFs), surge también la necesidad de desarrollar métodos apropiados, por lo que varios analistas modificaron el procedimiento de Mills para la determinación de OFs (Anastassiades *et al.*, 2003), entre estos está el procedimiento desarrollado por Storherr y Watts (1971), quienes al igual que en los métodos de Mills extrajeron con acetonitrilo, pero utilizaron CG con detector fotométrico de flama (FPD) y detector termoiónico de cloruro de potasio para la determinación de los OFs.

Posteriormente, se propusieron varios métodos para extender el rango de polaridad analítica y poder analizar plaguicidas OCs, OFs y organonitrogenados con un sólo procedimiento, por ejemplo, Luke *et al.* (1975) utilizaron acetona en lugar de acetonitrilo para la extracción y su posterior determinación con CG-FPD y CG con detector de captura de electrones (ECD).

Seis años después Luke *et al.* (1981) hicieron algunas modificaciones al método de extracción de Luke, eliminaron el paso de la purificación y utilizaron el detector de conductividad electrolítica (ELCD) en lugar del ECD, el cual es más susceptible a interferencias. El Método de Luke remplazo al método de Mills en el Manual Analítico de Plaguicidas publicado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos (US FDA, 1999) y varios años después se convirtió en un método oficial de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC, por sus siglas en inglés) (Sawyer, 1985). El método multirresiduos de Luke y sus variantes aún se sigue utilizando en muchos laboratorios de monitoreo de residuos de plaguicidas en todo el mundo (Anastassiades *et al.*, 2003).

Durante muchos años, la espectrometría de masas (EM) había sido considerada como la principal herramienta de confirmación de residuos de plaguicidas (Soboleva, 2004), pero con el desarrollo instrumental de la CG-EM se pueden lograr límites de detección tan bajos como los obtenidos con detectores selectivos tradicionales (Careri *et al.*, 2002). Autores como Fillion *et al.* (1995), Fillion *et al.* (2000) y Anastassiades *et al.* (2003) han publicado métodos multirresiduos en los cuales se utilizan CG-EM para la cuantificación de plaguicidas.

Los métodos analíticos deben ser validados para demostrar que son adecuados para determinar los analitos en las matrices de interés (Soboleva, 2004). Dado que los residuos están en cantidades pequeñas y en mezcla con una gran cantidad de materias orgánicas propias del producto vegetal, el proceso de análisis de residuos es un trabajo que requiere de un estricto control de calidad en cada uno de los pasos, de tal manera que la detección y la cuantificación se puedan llevar a cabo sin interferencias y con reproducibilidad (Segura, 1999). Los principales parámetros a establecer en la validación de los métodos analíticos son: recuperación, repetitividad, reproducibilidad, rango analítico y límites de detección y de cuantificación (Lehotay y Mastovska, 2005).

Los objetivos en este trabajo fueron validar la determinación de residuos de diazinón, dimetoato, clorpirifos, malatión y permetrina en tuna por cromatografía de gases y espectrometría de masas.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Preparación de la muestra

2.4.1.1. Estándares y reactivos

Los estándares de los plaguicidas se obtuvieron de Chemservice (West Chester, PA, USA); la pureza fue superior a 98% de la mayoría, excepto de permetrina (54% *cis* + 45% *trans*). Para preparar las soluciones madres (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) se pesaron exactamente las cantidades de los estándares y se disolvieron en acetona para almacenarla a -20°C . Las disoluciones estándares de trabajo se prepararon por dilución apropiada en acetona y se almacenaron a 4°C . Se emplearon disolventes como acetona, éter de petróleo y diclorometano (grado HPLC), al igual que el sulfato de sodio anhidro para el análisis de residuos se obtuvieron de J.T. Baker.

2.4.1.2. Homogeneización, extracción y partición de las muestras

Muestras de tuna (2 kg) sin tratar se trituraron y licuaron. El método de análisis se adaptó de Luke *et al.* (1981). Se pesaron 50 g de la muestra licuada en la jarra de la licuadora de laboratorio Hamilton Beach®, se agregaron 100 mL de acetona y se licuó durante 1 min a máxima velocidad. El extracto se filtró con vacío a través de un embudo Büchner de 10 cm de diámetro interno con papel filtro y el extracto se colectó en un matraz Kitasato de 250 mL.

En un embudo de separación de 250 mL se colocaron 40 mL del extracto a los que se le adicionaron 50 mL de éter de petróleo y 50 mL de diclorometano y se agitó durante 1 min. La fase acuosa se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 50 mL con 3 g de NaCl y se agitó hasta que la mayor parte del NaCl se disolvió. La fase orgánica (parte superior) se drenó del embudo de separación

pasándola a través de una pulgada de grosor de Na₂SO₄ sobre un embudo de tallo corto de cuatro pulgadas con lana de vidrio para retener el Na₂SO₄ y se colectó en un concentrador Kuderna-Danish (K-D) de 500 mL. La fase acuosa se regresó al embudo de separación, se le adicionaron 50 mL de diclorometano y se agitó durante 1 min. La fase orgánica (parte inferior) se drenó a través del mismo Na₂SO₄. La fase acuosa se sometió, nuevamente, a extracción con 50 mL de diclorometano y la fase orgánica resultante se drenó como se describe anteriormente. El Na₂SO₄ se lavó con 25 mL de diclorometano. Se adicionaron cuerpos de ebullición y se colocó una columna Snyder al K-D para iniciar la evaporación en baño maría. Cuando el líquido en el concentrador fue de aproximadamente 2 mL, se adicionaron 50 mL de éter de petróleo y se reconcentró a 2 mL, después se agregaron otros 25 mL de éter de petróleo y nuevamente se reconcentró a 2 mL. Por último se agregaron 10 mL de acetona y se reconcentró a casi 2 mL. El volumen final se ajustó a 3 mL.

2.4.1.3. Muestra equivalente en la solución final

La muestra equivalente se calculó con la fórmula (1):

$$50 * \frac{40}{100 + 42.5 - 10} * \frac{1}{3} = \frac{5.03 \cdot mg \cdot muestra \cdot equivalente}{\mu l \cdot extracto \cdot final} \dots\dots\dots(1)$$

Donde: 50 = g de muestra analizada; 40 = mL de extracto filtrado tomados para partición líquido-líquido; 100 = mL de acetona licuada con 50 g de muestra; 42.5 = cantidad (mL) de agua presente en la muestra, la tuna contiene 85% de agua (US FDA, 1999); 10 = ajuste para la concentración de volumen agua/acetona; y 3 = mL del volumen final.

2.4.2. Determinación

Se utilizó un Cromatógrafo de Gases (CG) HP-6890 acoplado a un espectrómetro de Masas (EM) HP-7953. La temperatura del puerto de inyección fue de 250°C, se utilizó una columna capilar HP 5ms® (30 m de longitud; 0.25 mm i.d.; 0.25 µm de espesor de la película). La temperatura inicial del horno fue de 80°C, después incrementó 20°C por min hasta alcanzar 130°C, temperatura que se mantuvo durante 0.5 min, después aumentó 7°C por min hasta alcanzar 220°C, la que se mantuvo durante 0.5 min y finalmente aumentó 20°C min⁻¹ hasta alcanzar 280°C y permaneció por 10 min. Se utilizó helio como gas acarreador. El EM fue operado en modo scan (rango *m/z*: 30-550) con ionización electrónica (70 eV). Las temperaturas del cuadrupolo, fuente de iones e interface fueron de 150, 230 y 280 °C, respectivamente. Se inyectó manualmente 1 µL de la muestra en modo splitless. Después de la última rampa de temperatura el horno se mantuvo a 280°C durante 10 minutos debido a la presencia de fitoesteros (campesterol, sitosterol, estigmasterol, entre otros) que eluyeron de la columna capilar después que la *trans*-permetrina. Los iones utilizados para la cuantificación e identificación de los plaguicidas se muestran en el Cuadro 9, los cuales son de los iones más abundantes o característicos en el espectro de masas de cada plaguicida (Figura 2).

Cuadro 9. Iones utilizados para la cuantificación e identificación de los plaguicidas.

Plaguicida	T _R (min) [†] [DE]	Iones [<i>m/z</i>] de diagnóstico	
		Cuantificación (AR)	Característicos (AR)
Dimetoato	11.314 [0.044]	87 (100)	93 (59), 125 (51), 58 (14)
Diazinón	12.405 [0.021]	137 (100)	179 (101), 152 (69), 93(36)
Malatión	14.746 [0.036]	173 (100)	125 (82), 127 (80), 93 (64)
Clorpirifos	14.992 [0.025]	197 (100)	199 (98), 97 (80), 125 (26)
<i>cis</i> -Permetrina	21.189 [0.016]	183 (100)	163 (19), 165 (17)
<i>trans</i> -Permetrina	21.312 [0.022]	183 (100)	163 (26), 165 (21)

TR= Tiempo de retención; DE= Desviación estándar; [†]Rango 0.1 a 100 µg mL⁻¹; AR= Abundancia relativa

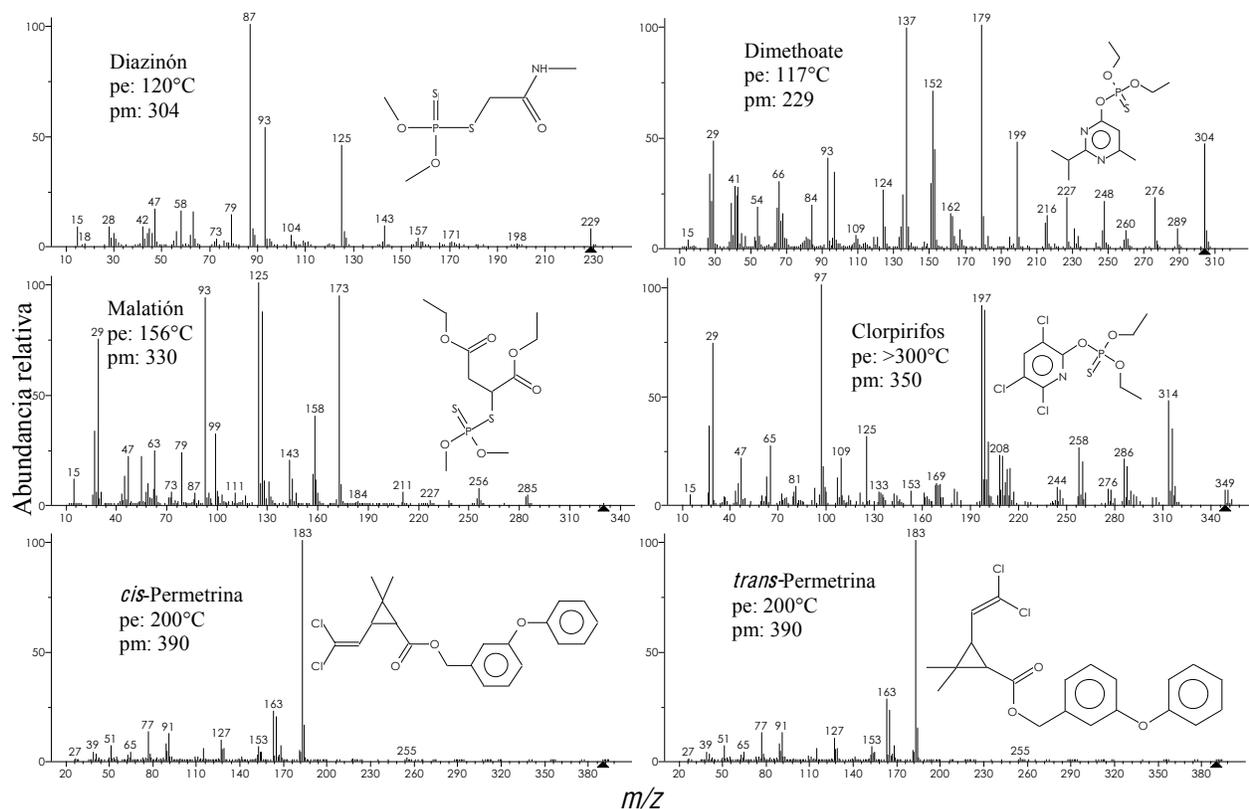


Figura 2. Espectros de masas y estructuras de los plaguicidas estudiados. pe= punto de ebullición; pm= peso molecular.

2.4.3. Parámetros de validación

2.4.3.1. Linealidad, rango analítico e interferencias

Se elaboró una curva estándar con los datos obtenidos de una inyección de 1 μL de los estándares a concentraciones de 0.1, 0.5, 2, 10, 20, 50 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en acetona. Se analizaron blancos de reactivos, blancos de matriz (tuna) y blancos de matriz fortificados con los plaguicidas para identificar posibles interferencias. En los blancos de reactivos se utilizó agua desionizada (45 mL) como matriz.

2.4.3.2. Límites de detección y de cuantificación

Los límites de detección y de cuantificación se determinaron con la metodología recomendada por la US EPA (2000). Primero se inyectaron cinco concentraciones (0.1, 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de los estándares de

plaguicidas en acetona y se obtuvieron las ecuaciones de regresión lineal, los límites de detección (L_{DI}) y de cuantificación (L_{QI}) instrumental se calcularon como 3 y 10 veces la desviación estándar (DE) de la regresión, respectivamente. Después se fortificaron siete blancos de matriz a $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ y la DE resultante se utilizó para estimar los límites de detección (L_{DM}) y de cuantificación (L_{QM}) del método como se describe en las fórmulas (2) y (3).

$$L_{DM} = t_{0.99} * DE \dots \dots \dots (2)$$

$$L_{QM} = 3 * L_D \dots \dots \dots (3)$$

Donde $t_{0.99}$ = valor de tablas de t de una cola a 99% de nivel de confianza para $n-1$ repeticiones ($n=7$).

2.4.3.3. Recuperación: precisión y exactitud

Para establecer la precisión y exactitud del método se analizaron siete muestras de blanco de matriz a las que se le adicionaron $100 \mu\text{L}$ de una solución de trabajo a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, de la mezcla de los plaguicidas, a los 50 g de muestra homogeneizada pesados en la jarra de la licuadora y se siguió todo el procedimiento; esto da como resultado concentraciones de $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$.

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1. Parámetros de validación

2.5.1.1. Linealidad, rango analítico e interferencias

Todos los compuestos exhibieron buena linealidad en el rango de 0.1 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ con coeficientes de correlación (R) mayores a 0.99 (Cuadro 10), cifra mínima utilizada para fines de cuantificación (Méndez *et al.*, 2008; US EPA, 1996).

Cuadro 10. Linealidad encontrada en los plaguicidas estudiados.

Plaguicida	Rango ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ecuación	R^2
Dimetoato	0.1 a 100	$y = -516011 + 2049754 * X$	0.9995
Diazinón	0.1 a 100	$y = -50321 + 3483207 * X$	0.9992
Malatión	0.1 a 100	$y = -350839 + 2949532 * X$	0.9997
Clorpirifos	0.1 a 100	$y = -112831 + 3390798 * X$	0.9995
<i>cis</i> Permetrina	0.1 a 100	$y = -181504 + 3232409 * X$	0.9998
<i>trans</i> Permetrina	0.83 a 83.34	$y = 9255.06285 + 3734355 * X$	0.9995

El problema más común en las aplicaciones de la CG-EM en muestras reales proviene de la elución de los componentes de la matriz que pueden interferir con la elución de los analitos de interés. Esto debido a que el EM detecta todos los compuestos, a diferencia de detectores selectivos (ECD, NPD, FPD, ELCD) que sólo detectan compuestos con halógenos, nitrógeno, fósforo, sulfuros u otros heteroátomos, según el detector (Mastovska y Lehotay, 2003). En la Figura 3 aparece un cromatograma de los estándares de los plaguicidas disueltos en acetona, los cuales se separaron claramente en la columna capilar. Las Figuras 4 y 5 corresponden a los cromatogramas de una muestra blanco (sin plaguicidas), mientras que los cromatogramas de la Figura 6 pertenecen a muestras de tuna fortificada con los plaguicidas, donde se observa que al momento de la elución de los picos de malatión y clorpirifos se presenta un pico interferente que corresponde al ácido *n*-hexadecanóico, identificado con la biblioteca de espectro de masas NIST 02.

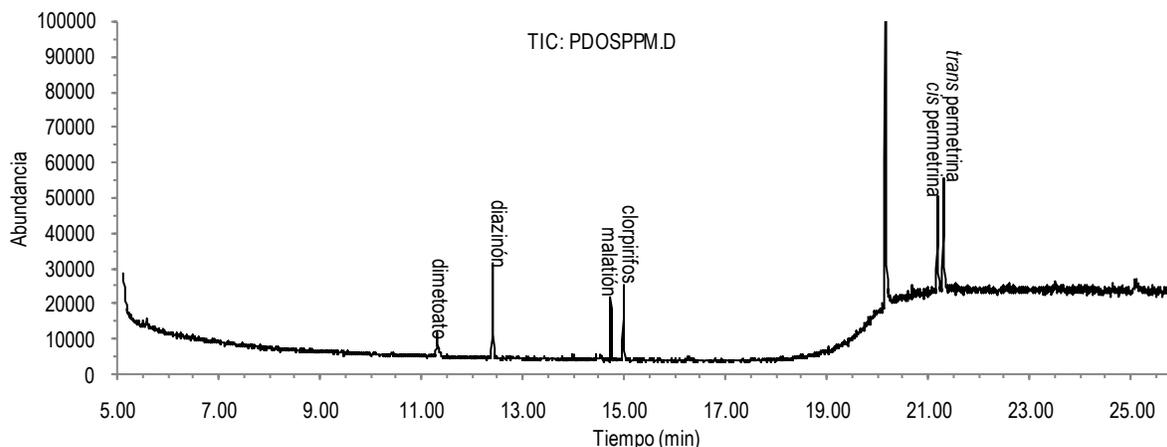


Figura 3. Cromatograma de iones totales de los estándares de los plaguicidas en acetona.

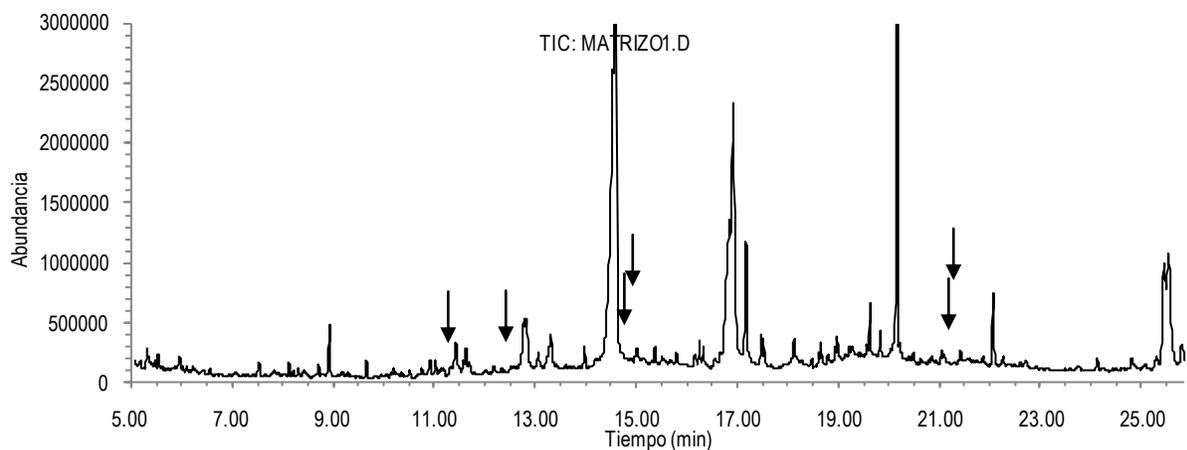


Figura 4. Cromatograma de iones totales de un blanco de extracto de tuna.

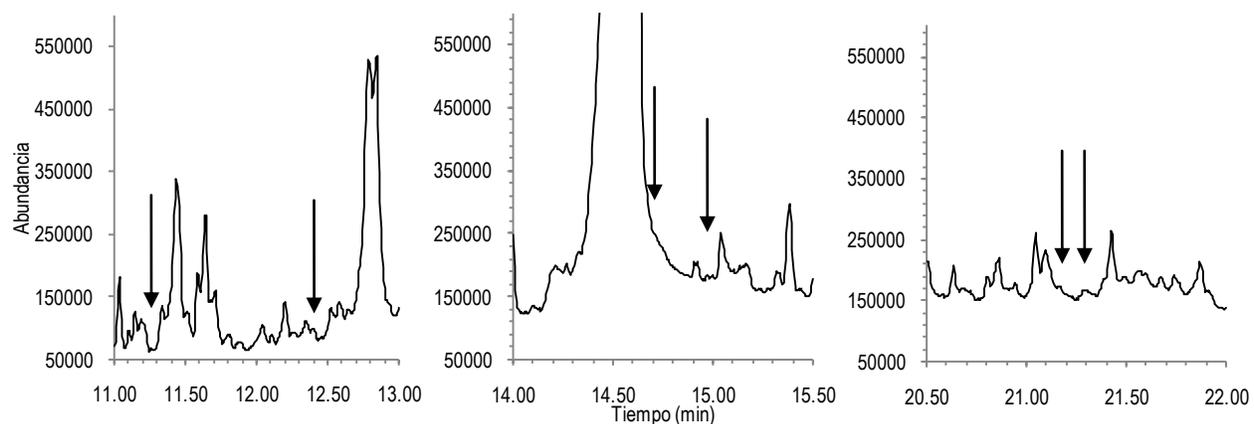


Figura 5. Cromatogramas de iones totales de un blanco de extracto de tuna. Las flechas indican el momento de elución de los plaguicidas.

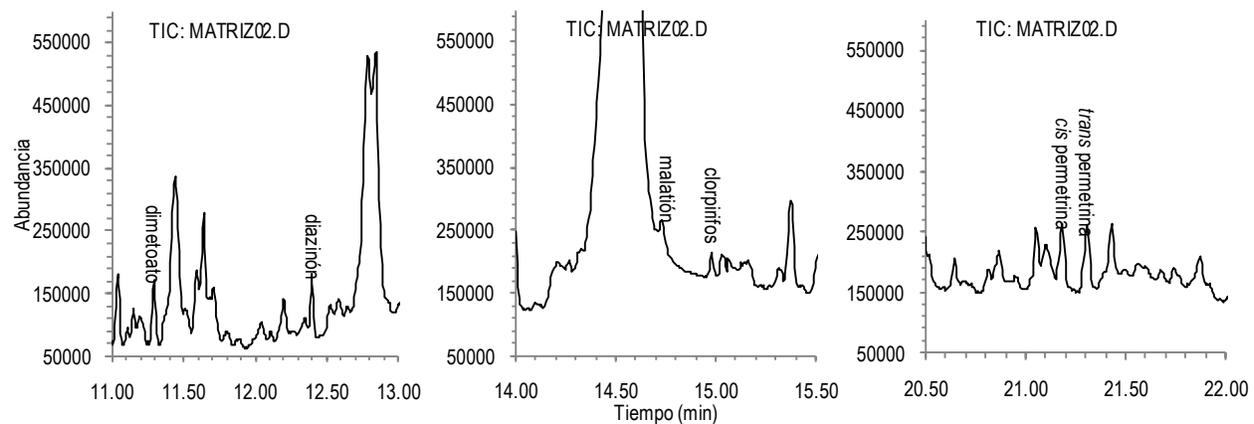


Figura 6. Cromatogramas de iones totales de extracto de tuna adicionada con los plaguicidas.

De acuerdo con Mastovska y Lehotay (2003), los criterios imperiosos para la confirmación de RdP por CG-EM son: (1) la presencia de al menos tres iones característicos del espectro de masas, (2) el pico cromatográfico debe tener el mismo tiempo de retención (TR) que el del estándar de referencia del compuesto, (3) la proporción de las abundancias relativas de los iones del patrón espectral obtenido debe coincidir con el estándar de referencia, (4) el radio del ruido de la señal de cada m/z (masa/carga) usada debe ser >3 , y (5) el blanco de matriz no debe presentar interferencias o picos en el mismo TR que el compuesto de interés (Figuras 7 y 8).

En los cromatogramas de iones extraídos (Figuras 7 y 8) se elimina el ruido generado por los componentes de la matriz. Los Iones de diagnostico indican la presencia de un compuesto de interés. Entre más iones se utilicen en el diagnostico (tres o más), se incrementa la confiabilidad en la identificación. En EM, se recomienda que los métodos cuantitativos incluyan criterios de identificación cuando cuantificación se basa en un solo ión. Si es posible, la comparación del patrón espectral obtenido se debe comparar con el espectro de masas característico de una biblioteca (Bethem *et al.*, 2003). A concentraciones altas, los patrones de los espectros son muy parecidos a los espectros de la biblioteca ya que son más abundantes que los iones de los componentes de la matriz, pero conforme se disminuyen las concentraciones algunos o muchos de los iones que forman el patrón del espectro desaparecen y son pocos los que permanecen.

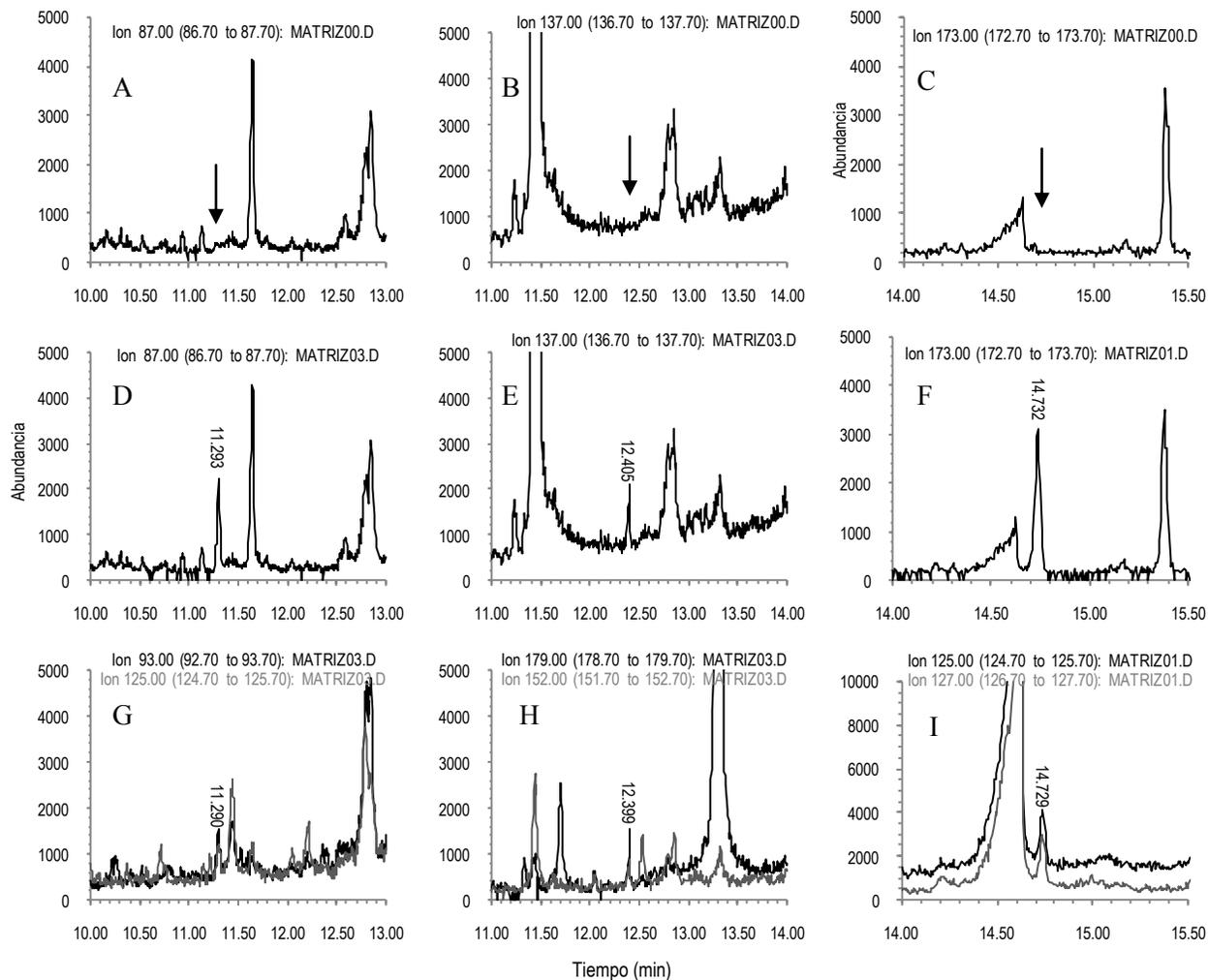


Figura 7. Cromatogramas de iones extraídos en muestras de tuna. Blancos de matriz (A, B y C); iones de cuantificación de dimetoato, diazinón y malatión, respectivamente, en una muestra de tuna adicionada con los plaguicidas (D, E y F); iones característicos de dimetoato, diazinón y malatión, respectivamente (G, H e I).

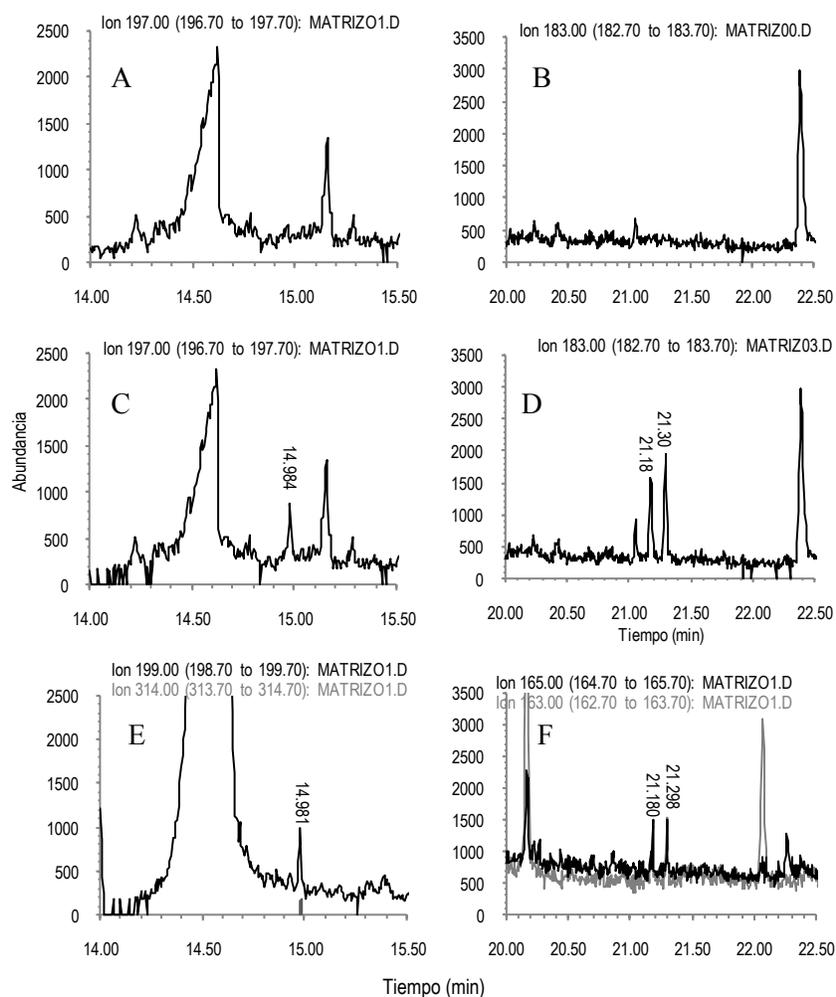


Figura 8. Cromatogramas de iones extraídos en muestras de tuna. Blancos de matriz (A y B); iones de cuantificación de clorpirifos y permethrina, respectivamente, en una muestra de tuna adicionada con los plaguicidas (C y D); iones característicos de clorpirifos y permethrina, respectivamente (E y F).

2.5.1.2. Límites de detección y de cuantificación

En el Cuadro 11 se muestran los parámetros utilizados para determinar los L_{DI} s y L_{QI} s. Estos dos términos sólo definen las limitaciones del instrumento de determinación y depende de varios factores como la sensibilidad del detector para el analito de interés y el ruido electrónico y del detector que pueden tener origen en la temperatura, en la inyección de la muestra, entre otros (Corley, 2003).

Cuadro 11. Límites de detección y cuantificación instrumental de los plaguicidas en disolvente analizados por CG-EM.

Insecticida	Parámetros de la ecuación				L _D I		L _Q I	
	Pendiente	Intercepto	R ²	DE	Área	µg mL ⁻¹	Área	µg/mL ⁻¹
Malatión [†]	2598657	-201558	0.9999	11829	35487	0.091	118290	0.123
Diazinón [†]	3398525	-237518	0.9999	15516	46548	0.084	155160	0.116
Dimetoato [†]	1542498	-152262	0.9994	39926	119778	0.176	399260	0.358
Clorpirifos [†]	3341611	-272102	0.9999	35773	107319	0.114	357730	0.188
<i>cis</i> -Permetrina [†]	3004298	-125689	0.9998	45000	135000	0.087	450000	0.192
<i>trans</i> - Permetrina [¶]	3714479	-188176	0.9999	18778	56334	0.066	187780	0.101

R²: coeficiente de determinación

DE: desviación estándar

L_DI: Límite de detección instrumental (L_DI=3*DE)

L_QI: Límite de cuantificación instrumental (L_QI=10*DE)

[†]Rango de 0.1 a 2.0 µg mL⁻¹

[¶]Rango de 0.083 a 1.667 µg mL⁻¹

De acuerdo con Seiber (1999), el L_DI para un analito generalmente es más bajo que el L_DM, pero cuando la muestra se concentra, el L_DM del método puede disminuir a valores menores que el L_DI, según el factor de concentración. En este caso, se obtuvieron 5.03 mg de muestra equivalente por µL de extracto final. Los límites de cuantificación del método (Cuadro 12) fueron menores que los respectivos LMRs propuestos en el Capítulo 2.

Corley (2003) hizo una revisión de metodologías para el cálculo de los límites de detección y de cuantificación, y concluyó que la metodología recomendada por la US EPA (2000) es la más práctica ya que incorpora efectos de la matriz, interferencias y la variabilidad de la eficiencia del método en el cálculo final, además de ser simple y fácil de aplicar.

Cuadro 12. Límites de detección (L_{DM}) y cuantificación (L_{QM}) del método para los plaguicidas en tuna.

Insecticida	Cantidad adicionada (mg kg ⁻¹)	Cantidad encontrada (exactitud, mg kg ⁻¹)		L_{DM}	L_{QM}
		Media	DE		
Malatión	0.1	0.0904	0.0089	0.0281	0.0844
Diazinón	0.1	0.0937	0.0067	0.0209	0.0627
Dimetoato [†]	0.1	0.0858	0.0094	0.0297	0.0890
Clorpirifos	0.1	0.0917	0.0063	0.0199	0.0597
<i>cis</i> -Permetrina	0.1	0.0925	0.0080	0.0253	0.0759
<i>trans</i> -Permetrina	0.0833	0.0903	0.0049	0.0153	0.0460

DE: Desviación estándar

$L_{DM} = t_{0.99} * DE$ ($t_{0.99}=3.143$; valor de tablas de t de Student de una cola con 6 grados de libertad ($n=7$) y 99% de nivel de confianza).

$L_{QM} = 3 * L_{DM}$.

2.5.1.3. Recuperación: precisión y exactitud

El método fue eficiente para la extracción de los residuos de los plaguicidas probados. Los porcentajes de recuperación variaron de 85.8 a 93.7% y los coeficientes de variación o desviaciones estándares relativas (DERs) fueron menores a 11%. (Figura 9). De acuerdo con Hill (2000) los promedios de recuperación deben estar en el rango de 70 a 110% y las DERs deben ser $\leq 20\%$. Los resultados obtenidos mostraron que el método fue reproducible y lo suficientemente sensible para la determinación de estos plaguicidas en tuna a niveles de residuos por debajo de los LMRs propuestos.

Con métodos de extracción similares al utilizado en este trabajo, Luke *et al.* (1975) obtuvieron recuperaciones de 96, 108 y 112% para diazinón, dimetoato y malatión, respectivamente, al utilizar el detector termoiónico de KCl. Asimismo, Luke *et al.* (1981) obtuvieron recuperaciones de 99, 115 y 108% para clorpirifos, diazinon y permetrin y utilizaron el detector fotométrico de flama (FPD). Sawyer (1985) reporta recuperaciones de clorpirifos de 100.2 a 118.1% con DERs de 4.0 a 17.8% en tomate, lechuga y fresa, donde utilizaron como detectores el FPD y el detector de conductividad electrolítica. La US FDA (1999) reporta recuperaciones mayores a 80% para los cinco plaguicidas.

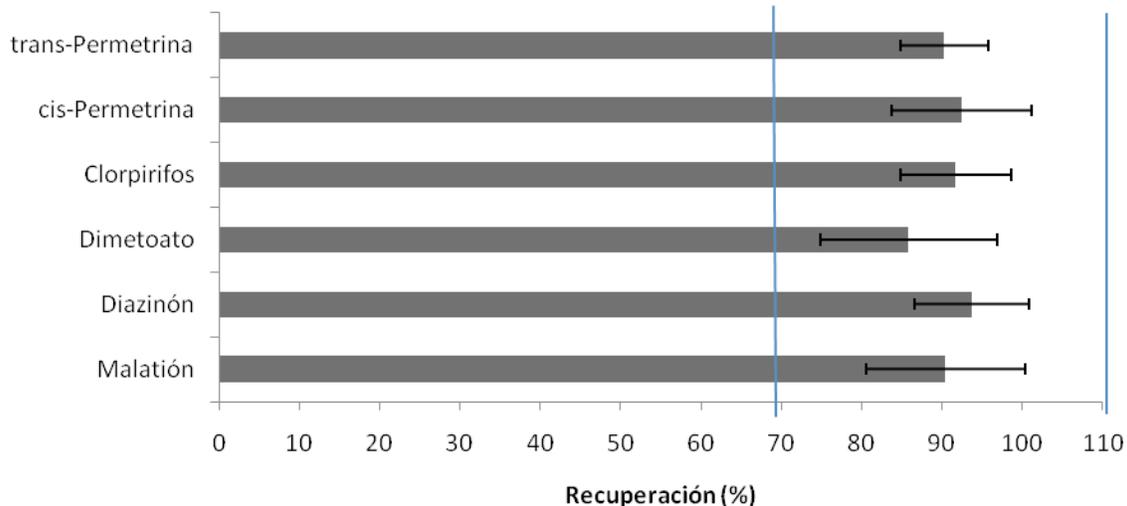


Figura 9. Porcentajes de recuperación de los plaguicidas estudiados. Las barras de error representan la desviación estándar relativa.

2.6. CONCLUSIONES

La linealidad y la precisión estuvieron dentro de los valores de referencia aceptados. Los porcentajes de recuperación variaron de 85.8 a 93.7% con un coeficiente de variación menor a 11%. El límite de cuantificación fue $\leq 0.08 \text{ mg kg}^{-1}$. El método fue eficiente para la determinación de estos plaguicidas a niveles de residuos por debajo de los LMRs propuestos.

2.7. LITERATURA CITADA

- Anastassiades, M. S. J. Lehotay, D. Štajnbaher y F. J., Schenck. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86(2): 412-431.
- Benfenati, E., M. Natangelo y S. Tavazzi. 2000. Gas chromatography/mass spectrometry methods in pesticide analysis. *In: Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Meyers, R. A. (ed). John Wiley & Sons. Chichester, England. pp. 6176-6201.
- Bethem, R., J. Boison, J. Gale, D. Heller, S. Lehotay, J. Loo, S. Musser, P. Price y S. Stein. 2003. Establishing the fitness for purpose of mass spectrometric methods. *J Am Soc Mass Spectrom.* 14: 528-541.

- Careri, M., F. Bianchi y C. Corradini. 2002. Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis. *J Chromatogr A*, 970 (1): 3-64.
- Corley J. 2003. Best practices in establishing detection and quantification limits for pesticide residues in foods. *In: Handbook of residue analytical methods for agrochemicals*. Lee, P. W., H. Aizawa, A. C. Barefoot y J. J. Murphy (eds). John Wiley & Sons. New York, USA. pp. 59-75.
- Fillion, J., F. Sauve and J. Selwyn. 2000. Multiresidue method for the determination of residues of 251 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection, *J. AOAC Int.* 83(3): 698-713.
- Fillion, J., R. Hindle, M. Lacroix and J. Selwyn. 1995. Multiresidue determination of pesticides in fruit and vegetables by gas chromatography-mass-selective detection and liquid chromatography with fluorescence detection, *J. AOAC Int.* 78(5): 1252-1266.
- Guo, J. y X., Zhang. 2005. A new analysis method with GC or GC-MS for the quick detection or pesticide residues in vegetables. *J. Chromat Sci.* 43: 158-163.
- Hill, A. 2000. Quality control procedures for pesticide residues analysis-guidelines for residues monitoring in the European Union. 2nd ed, 1999/2000. Document SANCO/3103/2000, European Commission, Athens, Greece. 30 p.
- Lehotay, S. J. y K. Mastovska. 2005. Determination of pesticide residues. *In: Methods of analysis of food components and additives*. Ötles, S. (ed). Taylor & Francis. Boca Raton, FL. pp. 329-359.
- Luke, M. A., J. E. Froberg, and H. T. Masumoto 1975. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *J Assoc Off Anal Chem.* 58(5):1020-1026.
- Luke, M. A., J. E. Froberg, G. M. Doose y H. T. Masumoto. 1981. Improved multiresidue gas chromatographic determination of organophosphorus, organonitrogen, and organohalogen pesticides in produce, using flame photometric and electrolytic conductivity detectors. *J Assoc Off Anal Chem.* 64(5):1187-1195.
- Mastovska, K. y S. J. Lehotay. 2003. Practical approaches to fast gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1000: 153-180.
- Méndez A., E., Y. Balcinde Q., V. González C. y E. Rodríguez C. 2008. Validation of an analytical method for quality control of residual solvents (n-hexane and acetone) in D-002: new active ingredient from beeswax. *J pharm Biomed Anal.* 47: 646-650.
- Mills, P. A., J. H. Onley, and R. A. Gaither. 1963. Rapid method for chlorinated pesticide residues in nonfatty foods. *J. Assoc. Offic. Agric. Chem.* 46(2): 186-191.

- Mills, P.A. 1959. Detection and semiquantitative estimation of chlorinated organic pesticide residues in food by paper chromatography. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 42(4): 734-740.
- Palmer, P. T. 2000. Gas chromatography/mass spectrometry. *In: Encyclopedia of Analytical Chemistry.* Meyers, R. A. (ed). John Wiley & Sons. Chichester, England. 14344 p.
- Sawyer, L. D. 1985. The Luke *et al.* method for determining multipesticide residues in fruit and vegetables: collaborative study. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 68(1): 64-71.
- Segura, M. A. 1999. Técnicas para determinar residuos de plaguicidas. *In: Hortalizas: plagas y enfermedades.* Anaya R. S. y J. Romero N. (eds). Trillas. Mexico, D. F. pp 376-392.
- Seiber, J. N. 1999. The analytical approach. *In: Pesticide residues in food: methods, techniques, and regulations.* Fong, W. G., H. A. Moye, J. N. Seiber, and J. P. Toth (ed). John Wiley & Sons. New York, USA. pp. 1-16.
- Soboleva, E., K. Ahad y A. Ambrus. 2004. Applicability of some mass spectrometric criteria for confirmation of pesticide residue. *The analyst.*
- Storherr, R. W. and T. Watts. 1971. A general method for organophosphorus pesticide residues in nonfatty food. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 54(3): 513-516.
- US EPA. 1996. Method 8000B, Determinative chromatographic separations. Resource Recovery and Conservation Act (RCRA), US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 46 p.
- US EPA. 2000. Assigning values to non-detected/non-quantified pesticide residues in human health food exposure assessments. Guidance Document: Office of Pesticide Programs, US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 33 p.
- US FDA. 1999. Pesticide analytical manual Volume I: Multiresidue methods. 3rd ed. US Department of Health and Human Services. United States Food and Drug Administration. Washington DC, USA.

CAPÍTULO III
DETERMINACIÓN DE ESPINOSINA A, ESPINOSINA D Y ABAMECTINA B1A
EN TUNA POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CON DETECTOR DE
ARREGLO DE DIODOS

3.1. RESUMEN

Se validó la determinación de spinosad y abamectina en tuna, la cual se llevó a cabo por cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos. Los residuos se extrajeron con el método multirresiduos QuEChERS; el procedimiento involucró la extracción de 10 g de tuna con 10 mL de acetonitrilo para llevar a cabo una partición líquido-líquido con 4 g de MgSO₄ anhidro y 1 g de NaCl. Después de la centrifugación, 6 mL del extracto se trasladaron a tubos de centrifuga que contenían 0.3 g de Amina Primaria Secundaria y 0.9 g de MgSO₄ anhidro, se agitó y se centrifugó. Finalmente, 4 mL del extracto se concentraron a 1 mL con una corriente de nitrógeno en baño maría. A blancos de matriz se les adicionaron los plaguicidas a 0.1 y 0.5 mg kg⁻¹. Los porcentajes de recuperación variaron de 96 a 103% con coeficientes de variación menores a 7.1%. Los límites de cuantificación del método fueron 0.013, 0.015 y 0.024 mg kg⁻¹ para espinosina A, espinosina D y abamectina B1a, respectivamente. El método fue eficiente para la determinación de estos plaguicidas a niveles de residuos por debajo de los LMRs propuestos.

Palabras clave: Insecticidas, QuEChERS, detección ultravioleta, Extracción en Fase Sólida Dispersiva, lactonas macrocíclicas, *Opuntia ficus-indica*.

3.2. ABSTRACT

Chapter III. Determination of spinosyn A, spinosyn D and abamectin B1a in prickly pear cactus fruit by liquid chromatography with diode array detector

The determination of spinosad and abamectin in prickly pear cactus fruit was validated, which has been carried out by high performance liquid chromatography with diode array detector. Residues were extracted using the QuEChERS method; the procedure involved the extraction of a 10 g sample with 10 mL acetonitrile, followed by a liquid-liquid partitioning step performed by adding 4 g anhydrous MgSO₄ plus 1.0 g NaCl. After centrifugation, 6 mL of the extract were taken into a tube containing 0.3 g primary secondary amine (PSA) sorbent plus 0.9 g anhydrous MgSO₄. Finally, 4 mL of the extract was concentrate to 1 mL in a nitrogen stream in water bath. Blank samples were spiked to 0.1 and 0.5 mg kg⁻¹ with each pesticide. The average recoveries varied from 97.4 to 102.1% with variation coefficients lower than 7.1%. The method quantitation limits were 0.013, 0.015 and 0.024 mg kg⁻¹ for spinosyn A, spinosyn D and abamectin, respectively. The method was reproducible and sensitive enough for the determination of these insecticides in prickly pear cactus fruit at residue levels under the proposed MRLs.

Keywords: Insecticides, QuEChERS, ultraviolet detection, dispersive solid phase extraction, macrocyclic lactones, *Opuntia ficus-indica*.

3.3. INTRODUCCIÓN

Spinosad y abamectina son lactonas macro-cíclicas naturales derivadas de la fermentación de los actinomicetos del suelo *Saccharopolyspora spinosa* (Thompson *et al.*, 2000) y *Streptomyces avermitilis* (Valenzuela *et al.*, 2001), respectivamente. Spinosad es comercializado como una mezcla de las espinosinas A y D (Figura 10), es un nuevo agente de control de insectos, en especial de larvas de lepidópteros, trips, moscas, termitas y algunos coleópteros (West *et al.*, 2000). Abamectina es una mezcla comercial de dos homólogos con actividad insecticida-acaricida, contiene más de 80% de abamectina B_{1a} y menos de 20% de abamectina B_{1b} (Figura 11) (Tomlin, 2000).

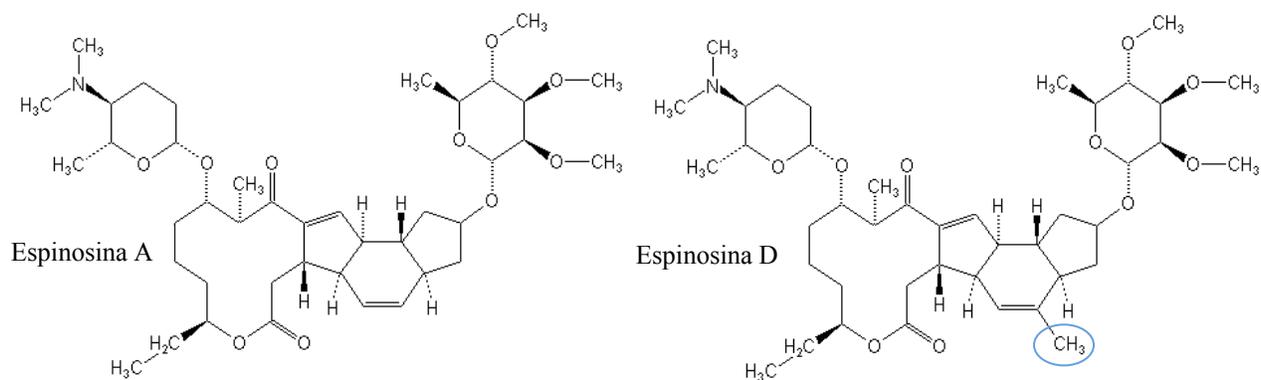


Figura 10. Estructuras de las espinosinas A y D.

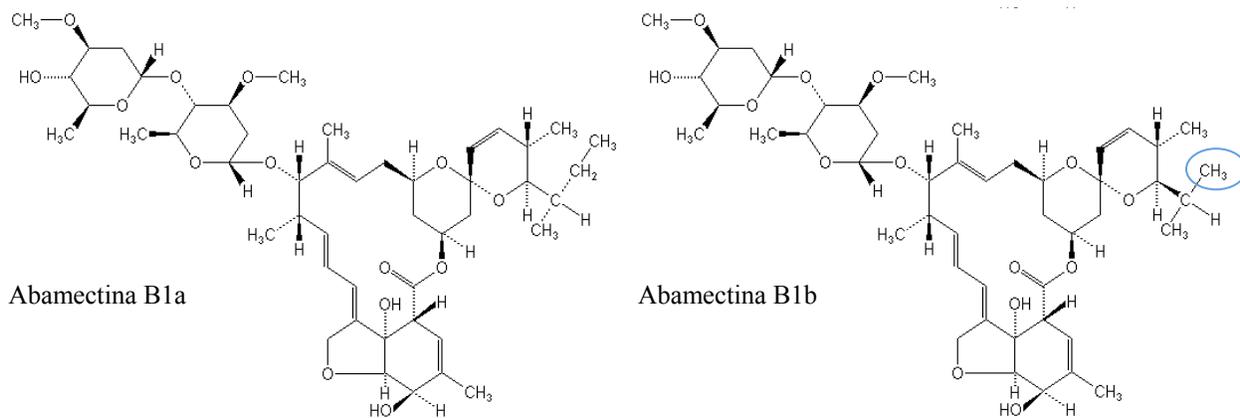


Figura 11. Estructuras de abamectina B_{1a} y B_{1b}.

Los métodos analíticos para la determinación de residuos de spinosad y abamectina en alimentos se fundamentan en esquemas complicados basados en la extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos (West *et al.*, 2000) o dispersión de la matriz en fase sólida (Valenzuela *et al.*, 2001), seguida por la purificación en cartuchos de extracción en fase sólida (Sharma *et al.*, 2007; Diserens, 1999) para posteriormente concentrar la muestra por evaporación. Dado que estas lactonas macro-cíclicas presentan altos puntos de ebullición y altos pesos moleculares (entre 732 y 873 uma), la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) representa la técnica de elección para la determinación de estos plaguicidas (Sannino, 2007) y se han descrito varios métodos de HPLC con detección ultravioleta (UV) (Vuik, 1991; Yeh *et al.*, 1997), por fluorescencia (FL)(abamectina) (Diserens y Henzelin, 1999), y por espectrometría de masas (EM) (Sannino, 2007).

En 2003, Anastassiades *et al.* introdujeron un método multiresiduos de análisis de residuos de plaguicidas (RdP) al que llamaron "QuEChERS", palabra compuesta por las iniciales inglesas de las palabras "**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged and **S**afe" (rápido, fácil, barato, eficaz, robusto y seguro) y permite a una sola persona preparar seis muestras, previamente homogeneizadas, en 30 minutos. El método emplea acetonitrilo para la extracción por partición, la purificación se hace por centrifugación con la técnica conocida como extracción en fase sólida dispersiva y la determinación se llevaba a cabo por cromatografía de gases y EM, pero en 2005, Lehotay *et al.* validaron la determinación de RdP por HPLC con EM en tándem. Lehotay (2005) menciona como detectores alternativos para HPLC el de FL, el de arreglo de diodos (DAD) y el UV-visible con la misma técnica de preparación de la muestra.

Los objetivos en este trabajo fueron: validar la determinación de residuos de spinosad y abamectina en tuna por HPLC con DAD al utilizar el método de extracción "QuEChERS".

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. Preparación de la muestra

3.4.1.1. Estándares y reactivos

Los estándares de spinosad (98% de espinosina A + D) y abamectina (89% de B1a y 3% de B1b) se obtuvieron de Chemservice (West Chester, PA, USA). Para preparar las soluciones madres ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) se pesaron exactamente las cantidades de los estándares y se disolvieron en metanol para almacenarla a -20°C . Las disoluciones estándares de trabajo se prepararon por dilución apropiada en metanol y se almacenaron a 4°C . Se emplearon disolventes como agua, metanol y acetonitrilo (grado HPLC) de J. T. Baker. El sulfato de magnesio anhidro, el cloruro de sodio, el acetato de sodio, el adsorbente Amina Primaria y Secundaria (PSA) para el análisis de residuos se obtuvieron de Sigma Aldrich, J.T. Baker (NaCl y acetato de sodio) y Varian, respectivamente.

3.4.1.2. Pasos preliminares y homogeneización de la muestra

Se prepararon varios viales con 4 ± 0.1 g de MgSO_4 anhidro más 1.0 ± 0.1 g de NaCl y se almacenaron cerrados a temperatura ambiente hasta que se utilizaron. También se prepararon tubos para centrifuga de 15 mL de polipropileno con 0.3 ± 0.02 g de Amina Primaria Secundaria (PSA) más 0.9 ± 0.02 g de MgSO_4 anhidro antes de los experimentos.

Cinco muestras de tuna (*Opuntia ficus-indica*, Variedad: Tuna roja San Martín) sin tratar se trituraron y se licuaron. Después se tomaron submuestras de 50 g y se homogeneizaron a 13,000 rpm durante dos minutos (homogeneizadora Dolping®). Una segunda submuestra de 10 g se tomó para la extracción y el resto se selló y almacenó a congelación.

3.4.1.3. Extracción y purificación: método QuEChERS

Se pesaron 10 ± 0.05 g de muestra homogeneizada en un tubo de centrifuga de 50 mL de polipropileno, a los que se le adicionaron 10 mL de acetonitrilo, se taparon y se agitaron durante un minuto en un vortex. Posteriormente, se le agregaron 4 g de MgSO_4 anhidro y 1 g de NaCl, se agitaron durante 1 min con la mano y se centrifugaron a 3000 rpm durante dos minutos. Se tomaron 6 mL del extracto (capa superior) en tubos de centrifuga de 15 mL que contenían 0.3 g de PSA y 0.9 g de MgSO_4 anhidro, se agitaron durante 20 s y se centrifugaron a 3000 rpm durante 2 min. Por ultimo, se tomaron 4 mL y se concentraron a 1 mL en baño maría a 50°C con una corriente de nitrógeno y se transfirió a viales para automuestreador pasándolo a través de un acrodisco de nylon de $0.45 \mu\text{m}$.

3.4.2. Determinación

Se utilizó un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución HP 1100 con automuestreador y detector de arreglo de diodos (DAD). Se usó una columna Hypersil C_{18} (250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno) a 30°C . Para spinosad, la fase móvil consistió de 44% acetonitrilo, 44% metanol y 12% de agua con 2% de acetato de amonio y el detector fue operado a 250 nm (Yeh *et al.*, 1997; Gao *et al.*, 2007) con un tiempo total de corrida de 12 min. Para abamectina, se utilizó como fase móvil 94% acetonitrilo y 6% de agua y el DAD fue operado a 245 nm (Valenzuela *et al.*, 2001; Diserens y Henzelin, 1999) con un tiempo total de corrida de 18 min. El volumen de inyección fue de $100 \mu\text{L}$ a un flujo de 2.0 mL min^{-1} .

3.4.3. Parámetros de validación

Para estudiar la linealidad y el rango analítico se elaboró una curva estándar con los datos obtenidos de una inyección de los estándares a concentraciones de 0.1, 1, 2, 5 y $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ en metanol. Se analizaron blancos de reactivos (con 9 mL de agua grado HPLC), blancos de matriz (tuna) y

blancos de matriz fortificados con los plaguicidas para identificar posibles interferencias.

Al igual que en el Capítulo 3, primero se determinaron los límites de detección (L_{DI}) y de cuantificación (L_{QI}) instrumental y después los límites de detección (L_{DM}) y de cuantificación (L_{QM}) del método según la metodología recomendada por la US EPA (2000).

Para establecer la precisión y exactitud del método se analizaron siete muestras de blanco de matriz a las que, después de agregar los 10 mL de acetonitrilo, se le adicionaron 20 y 100 μL de una solución de trabajo a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de spinosad y abamectina a 10 g de muestra homogeneizada (esto da como resultado concentraciones de 0.1 y 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente), se agitó por 45 s y se dejó reposar durante 15 min para exponer al plaguicida en contacto con la matriz para después agregar el MgSO_4 y NaCl . La recuperación (r) se determinó con la fórmula (4):

$$r = (\text{cantidad encontrada} \div \text{cantidad adicionada}) * 100 \dots \dots (4)$$

También se prepararon curvas de calibración en extracto de matriz donde se utilizaron concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 y 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, éstas se utilizaron para la cuantificación con la siguiente fórmula (5):

$$\text{Conc} = (\text{área} - \text{intercepto}) \div (\text{pendiente} * \text{muestra equivalente}) \dots \dots (5)$$

3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1. Optimización

Inicialmente, se probó como fase móvil una mezcla de metanol-agua (90:10, v:v) misma que utilizaron Vuik (1991) y Valenzuela *et al.* (2001). Aunque se obtuvo buena respuesta del equipo para abamectina en disolvente a un flujo de 0.8 mL por minuto, en los extractos, a concentraciones bajas el

ruido de la matriz causaba interferencias en la elución de abamectina. En el caso de spinosad con esta fase móvil, la eficiencia fue mala ya que produjo picos muy anchos y la resolución fue baja entre los picos correspondientes a Espinosina A y D al no haber una clara separación, aún aumentando el flujo a 2.0 mL min⁻¹.

Se probaron volúmenes de inyección de 20, 60 y 100 µL, en ninguno de estos volúmenes se perdió la linealidad en la respuesta del equipo en las diferentes concentraciones. Se optó por inyectar 100 µL, máxima capacidad del equipo, para disminuir el límite de detección.

3.5.2. Parámetros de validación

Los compuestos exhibieron buena linealidad en el rango de 0.1 a 50 µg mL⁻¹ con coeficientes de correlación (*R*) mayores a 0.99 (Cuadro 13), cifra mínima utilizada para fines de cuantificación (Méndez *et al.*, 2008; US EPA, 1996).

Cuadro 13. Linealidad encontrada dentro del rango de 0.1 a 50 µg mL⁻¹ de spinosad y abamectina analizados por HPLC-DAD.

Plaguicida	T _R (DE)	Rango (µg mL ⁻¹)	Ecuación (y=a+bx) [†]	R ²
Espinosina A	2.838 (0.055)	0.081-40.5	y = 1.72634 + 26.17266*x	0.9999
Espinosina D	5.729 (0.050)	0.019-9.5	y = 0.820347 + 26.6935*x	0.9999
Abamectina B _{1a}	6.852 (0.064)	0.1 - 50	y = 1.18806 + 127.68112*x	0.9999

T_R= tiempo de retención; DE= desviación estándar; [†]donde: y=area, a=intercepto, b=pendiente, x=concentración; R²= coeficiente de determinación;

En la Figuras 12 y 13 se muestran cromatogramas de los blancos de matriz (tuna) y de muestras de tuna adicionadas con spinosad y abamectina, respectivamente.

A

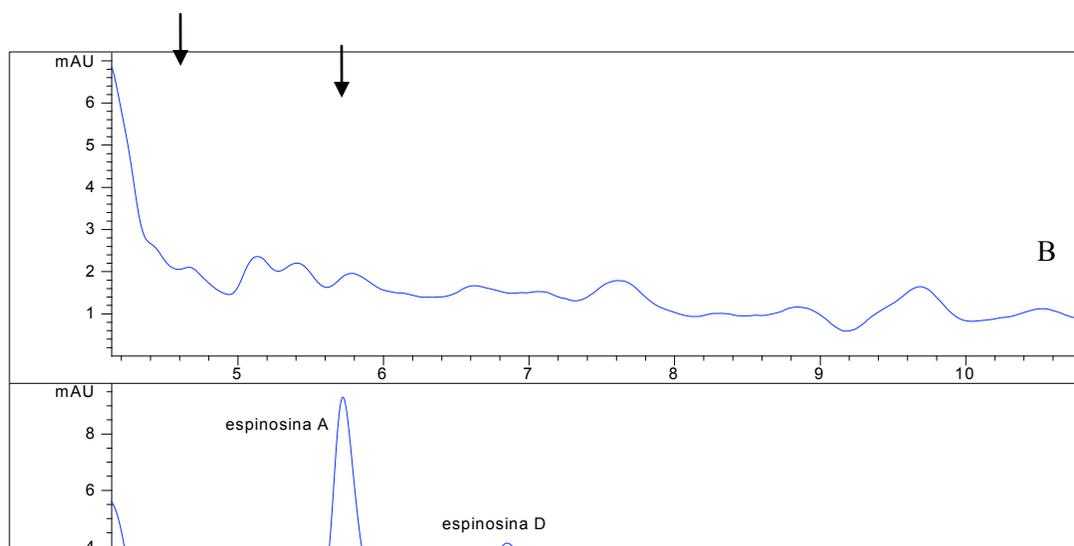


Figura 12. Cromatograma de un blanco de matriz (A) y spinosad fortificado a $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (B).

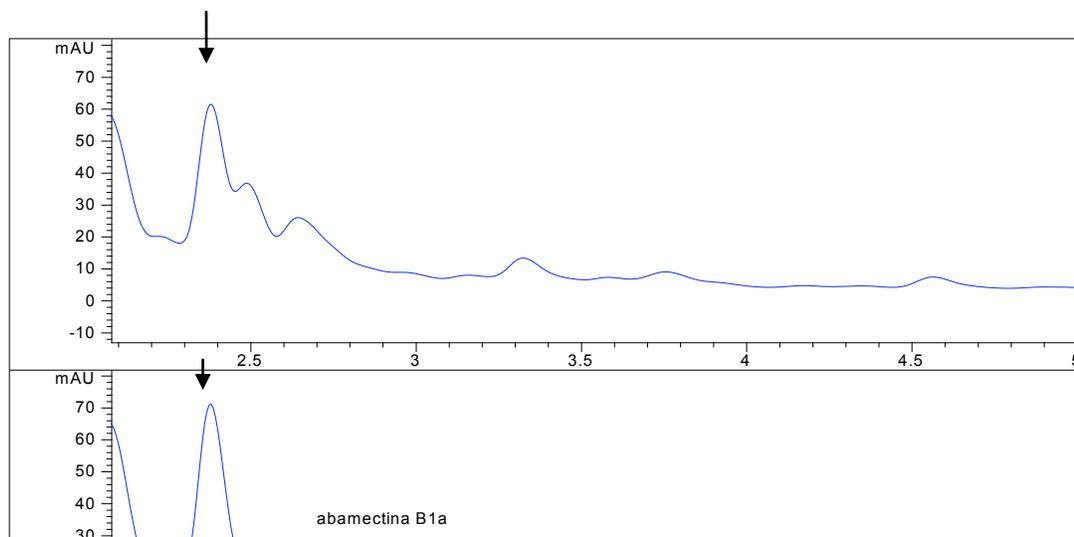


Figure 13. Cromatograma de un blanco de matriz (arriba) y abamectina fortificado a $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (abajo).

Los límites de detección y de cuantificación instrumental se muestran en el Cuadro 14. Con estas condiciones los $LQIs$ no fueron lo suficientemente bajos por lo que se decidió concentrar el extracto final de 4 a 1 mL antes de la determinación.

Cuadro 14. Límites de detección (L_{DI}) y cuantificación (L_{QI}) instrumental de los plaguicidas en disolvente analizados por HPLC-DAD.

Insecticida	Parámetros de la ecuación				L_{DI}		L_{QI}	
	Pendiente	Intercepto	R^2	DE	Área	$\mu\text{g mL}^{-1}$	Área	$\mu\text{g mL}^{-1}$
Espinosina A [†]	47.74447	-1.6075	0.9999	0.3600	1.0799	0.056	3.5995	0.109
Espinosina D ^{††}	36.29762	-0.46931	0.9999	0.2690	0.8069	0.035	2.6896	0.087
Abamectina B _{1a} ^{†††}	125.4473	1.82692	0.9992	1.9635	5.8904	0.032	19.634	0.142

[†] Rango de 0.081 a 1.62 $\mu\text{g mL}^{-1}$

^{††} Rango de 0.019 a 0.95 $\mu\text{g mL}^{-1}$

^{†††} Rango de 0.1 a 2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$

R^2 = Coeficiente de determinación

DE= Desviación estándar

L_{DI} = (((3*DE)-intercepto)/pendiente)

L_{QI} = (((10*DE)-intercepto)/pendiente)

Los límites de detección y de cuantificación del método (Cuadro 15) se afectaron por la concentración de la muestra, ya que se obtuvieron 4 mg de muestra equivalente por μL de extracto final.

Cuadro 15. Porcentajes de recuperación, límites de detección (L_{DM}) y cuantificación (L_{QM}) del método para spinosad y abamectina en tuna.

Insecticida	Cantidad adicionada (mg kg^{-1})	Cantidad encontrada (mg kg^{-1})		L_{DM}	L_{QM}
		Media	DE		
Espinosina A	0.02754	0.0273	0.0014	0.0045	0.0134
Espinosina D	0.02185	0.0223	0.0016	0.0050	0.0149
Abamectina B _{1a}	0.03600	0.0351	0.0021	0.0078	0.0235

DE: Desviación estándar

L_{DM} = $t_{0.99} * DE$ ($t_{0.99}=3.143$; valor de tablas de t de Student de una cola con 6 grados de libertad ($n=7$) y 99% de nivel de confianza).

L_{QM} = $3 * L_{DM}$.

Se encontró que existe una interferencia proveniente de los reactivos utilizados (Figuras 5 y 6), por lo cual los compuestos se cuantificaron con curvas de calibración en extracto blanco de tuna (Cuadro 16).

Cuadro 16. Curva de calibración en extracto de matriz (n=5) de spinosad y abamectina.

Plaguicida	Rango ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ecuación	R^2
Espinosina A	0.081-4.05	$y = 1.46735 + 42.78034 * X$	0.9992
Espinosina D	0.095-0.95	$y = -1.28034 + 44.24007 * X$	0.9992
Abamectina B _{1a}	0.1 - 5	$y = -19.81462 + 93.33434 * X$	0.9997

Los porcentajes de recuperación variaron de 97.4 a 102.1% y las desviaciones estándares relativas (DERs) fueron menores a 7.1% (Figura 14) los cuales se encuentran dentro de los valores de referencia aceptables (Hill, 2000).

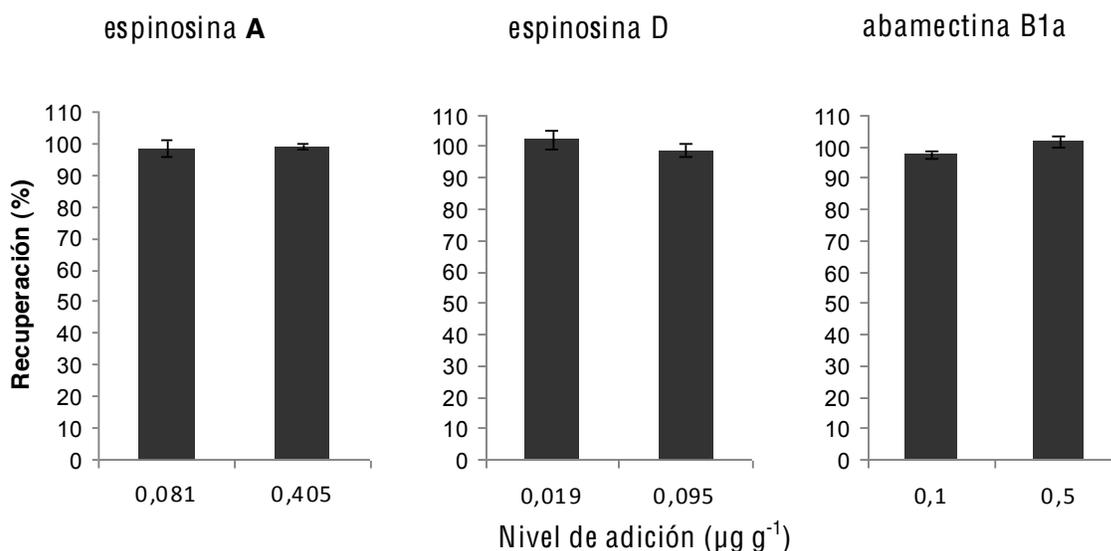


Figura 14. Porcentajes de recuperación de spinosad y abamectina con el método de extracción QuEChERS y la determinación por HPLC y DAD. Las barras de error representan la desviación estándar relativa.

Al utilizar el método QuEChERS para la extracción de RdP Lehotay *et al.* (2005) reportaron recuperaciones entre 90 y 110% con DER $\leq 10\%$ para spinosad en lechuga y naranja y L_QM de 0.01 mg kg⁻¹, mientras que Zywitz *et al.* (2004) obtuvieron recobros de 82 a 109% con DERs entre 0.8 y 12% de spinosad, abamectina y otras lactonas macro-cíclicas en berenjena, fresa, melón y tomate con L_QM de 0.007 mg kg⁻¹. En ambos trabajos se empleó HPLC-EM en tándem para la determinación.

Según los responsables del desarrollo del método, el análisis es más fácil y más económico que los que emplean químicos analíticos en materia de

residuos de plaguicidas (RdP) y esta simplicidad implica una reducción de los costes de materiales de hasta 4 veces, comparado con los métodos tradicionales.

El nuevo sistema consiste en dos tubos individuales para centrifuga, que puede usarse más de una vez. El método genera 10 mililitros de desechos de disolvente, comparado con los 416 mililitros generados por el método modificado de Luke. Zywitz *et al.* (2004) mencionan que el método QuEChERS permite preparar 8 muestras en 30 min. Sin embargo, en el paso de concentración se requieren de 30 min más.

3.6. CONCLUSIONES

La linealidad, precisión y exactitud estuvieron dentro de los valores estándares de referencia aceptables. Los porcentajes de recuperación variaron de 97.4 a 102.1% con un coeficiente de variación menor a 7.1%. Los límites de detección espinosina A, espinosina D y abamectina B1a fueron 0.0134, 0.0149 y 0.0235 mg kg⁻¹, respectivamente. Los resultados obtenidos mostraron que el método fue reproducible y lo suficientemente sensible para la determinación de estos plaguicidas en tuna a niveles de residuos por debajo de los LMRs propuestos.

3.7. LITERATURA CITADA

- Anastassiades, M. S. J. Lehotay, D. Štajnbaher y F. J., Schenck. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86(2): 412-431.
- Diserens, H. y M. Henzelin. 1999. Determination of abamectin residues in fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 833: 13-18.
- Gao, R., J. Dong, W. Zhang y W. L. Chen. 2007. Dietary risk assessment of spinosad in China. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 49: 31-42.
- Hill, A. 2000. Quality control procedures for pesticide residues analysis-guidelines for residues monitoring in the European Union. 2nd ed,

- 1999/2000. Document SANCO/3103/2000, European Commission, Athens, Greece. 30 p.
- Lehotay, S.J. 2005. Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) approach for determining pesticide residues. *In: Methods in Biotechnology*, Vol. 19, Pesticide Protocols, J. L. Martinez V. y A. Garrido Frenich (eds), Humana Press, Totowa, NJ, pp 239–261.
- Lehotay, S.J., De Kok, A., Hiemstra, M., y Van Bodegraven, P. 2005. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.* 88(2): 595-614.
- Méndez A., E., Y. Balcinde Q., V. González C. y E. Rodríguez C. 2008. Validation of an analytical method for quality control of residual solvents (n-hexane and acetone) in D-002: new active ingredient from beeswax. *J pharm Biomed Anal.* 47: 646-650.
- Sannino A. 2007. Determination of three natural pesticides in processed fruit and vegetables using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21: 2079-2086.
- Seiber, J. N. 1999. The analytical approach. *In: Pesticide residues in food: methods, techniques, and regulations.* Fong, W. G., H. A. Moye, J. N. Seiber, and J. P. Toth (ed). John Wiley & Sons. New York, USA. pp. 1-16.
- Sharma, A., A. Srivastava, B. Ram, y P. C. Srivastava. 2007. Dissipation behaviour of spinosad insecticide in soil, cabbage and cauliflower under subtropical conditions. *Pest Manag Sci.* 63:1141–1145.
- Thompson, G. D., R. Dutton y T. C. Sparks. 2000. Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme. *Pest Manag Sci* 56:696-702.
- Tomlin C. D. S. 2000. The e-pesticide manual, a world compendium of pesticides. 12th edition. British Crop protection council. Surrey, UK. CD-ROM.
- Valenzuela, A. I., D. S. Popab, M. J. Redondoc y J. Mañes. 2001. Comparison of various liquid chromatographic methods for the analysis of avermectin residues in citrus fruits. *J. Chromatogr. A.* 918: 59–65.
- Vuik, J. 1991. Rapid determination of abamectin in lettuce and cucumber by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 553: 299-304.
- West, S. D., L. T., Yeh, L. G., Turner, D. A., Schwedler, A. D., Thomas, y D. O., Duebelbeis. 2000. Determination of spinosad and its metabolites in food and environmental matrices. 1. High-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Agric. Food Chem.*, 48(11): 5131-5137.
- Yeh, L. T., D. A., Schwedler, G. B., Schelle y J. L., Balcer . 1997. Application of Empore Disk Extraction for Trace Analysis of Spinosad and Metabolites in Leafy Vegetables, Peppers, and Tomatoes by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *J. Agric. Food Chem.* 45(5): 1746-1751.
- US EPA. 1996. Method 8000B, Determinative chromatographic separations. Resource Recovery and Conservation Act (RCRA), US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 46 p.

- US EPA. 2000. Assigning values to non-detected/non-quantified pesticide residues in human health food exposure assessments. Guidance Document: Office of Pesticide Programs, US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 33 p.
- Zywitz, D., M. Anastassiades y E. Scherbaum. 2004. Simultaneous determination of macrocyclic lactone insecticides in fruits and vegetables using LC-MS/MS. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. 100(4): 140-150.

CAPÍTULO IV

INTERVALOS DE SEGURIDAD DE PLAGUICIDAS EN TUNA

4.1. RESUMEN

Se estudio la disminución de los residuos de siete plaguicidas en tuna para determinar los intervalos de seguridad apropiados en relación con los Límites Máximos de Residuos propuestos. En 2006, se realizaron dos aplicaciones de los plaguicidas diazinón, clorpirifos, dimetoato, malatión y permetrina a la dosis máxima recomendada en las etiquetas. A partir de la segunda aplicación, se realizaron los muestreos a los 0, 3, 7, 14, 21 y 28 días después de la aplicación (DDA) y la determinación de sus residuos se hizo por cromatografía de gases y espectrometría de masas. En 2007, se aplicaron spinosad y abamectina, se muestreó a los 0, 1, 3, 7 y 14 DDA y sus residuos se analizaron por cromatografía de líquidos de alta resolución y detector de arreglo de diodos. Las curvas de disipación se definieron matemáticamente para determinar las relaciones óptimas entre los residuos de plaguicidas y el tiempo. Los intervalos de seguridad propuestos de diazinón, clorpirifos, dimetoato, malatión, permetrina, spinosad y abamectina para tuna son de 10, 17, 16, 4, 4, 5 y 2 días, respectivamente.

Palabras clave: intervalo precosecha, límites máximos de residuos, residuos de plaguicidas, buenas prácticas agrícolas, *Opuntia ficus-indica*.

4.2. ABSTRACT

Chapter IV. Safety intervals of pesticides in prickly pear cactus fruit

The declines of residues of seven pesticides on prickly pear cactus fruit were studied to determine appropriate preharvest intervals for compliance with proposed maximum residue limits. In 2006, the insecticides diazinon, chlorpyrifos, dimethoate, malathion and permethrin were applied two times at maximum labeled doses. From the second application, the samplings were carried out at 0, 3, 7, 14, 21, and 28 days after application (DAA) and the residue determination were made by gas chromatography and mass spectrometry. In 2007, the pesticides spinosad y abamectin were applied and the samplings were made at 0, 1, 3, 7, and 14 DAA and the residues were analyzed by high performance liquid chromatography with diode array detector. Mathematically defined decline curves were established by determining optimal relationship between pesticide residues and time. The proposed safety intervals for diazinon, chlorpirifos, dimethoate, malathion, permethrin spinosad and abamectin in prickly pear cactus fruit are 10, 17, 16, 4, 4, 5 and 2 days, respectively.

Key words: preharvest intervals, maximum residue limits, pesticide residues, good agriculture practices, *Opuntia ficus-indica*.

4.3. INTRODUCCIÓN

Los estudios de disipación de plaguicidas tienen como objetivos identificar las rutas por medio de las cuales estos agroquímicos se disipan en el ambiente, así como los mecanismos de degradación y los productos derivados de ésta; además, permiten conocer cuanto tiempo permanecen los ingredientes activos en el ambiente y sus elementos, incluidos los productos agrícolas destinados al consumo humano (Coscolla, 1993).

Después de la aplicación de plaguicidas con los principios de buenas practicas agrícolas (BPA), se efectúan muestreos periódicos de la parte comercial (o comestible) del cultivo, las cuales son sometidas a análisis de laboratorio para determinar los niveles de RdP en cada fecha (FAO, 2002). Esta información, expresada en mg kg^{-1} (ppm), posteriormente se asocia a los tiempos de muestreo expresados como días después de la aplicación. Las BPA definen la máxima tasa de aplicación, el número máximo de aplicaciones, el mínimo intervalo de seguridad o precosecha, y los periodos de reentrada que se requieren para proveer un control eficaz de una plaga específica en determinada área geográfica (Harris y Hill, 2004).

Para describir el proceso de disminución de RdP se utilizan varios términos, entre ellos, ruptura, declive, declinación, degradación o disipación, y en muchos casos estos términos son manejados como sinónimos, aunque estrictamente hablando los términos ruptura, degradación y disipación no son correctos (Freshe *et al.*, 1995). Las curvas de disipación (disminución, declinación o degradación) son la representación más genuina de la evolución de los residuos de un determinado plaguicida en condiciones dadas, ya que dan registros del nivel de residuos en función del tiempo (Timme y Freshe, 1980). Las curvas de disipación permiten determinar el tiempo necesario para que el valor del residuo alcance o sea inferior al LMR permitido por la ley (Cabras, 2003). Es decir, de esta forma se puede averiguar el tiempo de espera, plazo de seguridad, tiempo de carencia, intervalo precosecha o intervalo de seguridad a transcurrir entre el tratamiento y la cosecha.

Los niveles de residuos de un ingrediente activo usado como producto de protección vegetal en una planta de dada especie, primariamente dependen las dosis por unidad de superficie y de las condiciones climáticas. Las diferencias en formulación, métodos de aplicación, entre otros, son factores de importancia secundaria. Los datos obtenidos de preferencia a las máximas dosis y el mayor número de aplicaciones posibles se usan para determinar niveles máximos de residuos en un cultivo (CEC, 1997).

El objetivo en este trabajo fue obtener las curvas de disipación de diazinón, clorpirifos, dimetoato, malatión, permetrina, spinosad y abamectina en tuna para determinar los intervalos de seguridad a respetar para que sus residuos estén por debajo de los LMRs propuestos.

4.4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1. Aplicaciones en campo

Las parcelas experimentales se establecieron en los predios “Los Alacranes” (2006) y “San Javier” (2007), huertas comerciales de 10 y 7 años de edad, respectivamente, cercanas a la cosecha de la comunidad de San Felipe Teotitlan, Nopaltepec, México. Cada unidad experimental consistió de dos plantas de tuna (*Opuntia ficus-indica*, Variedad: Tuna roja San Martín) cuyo trazo de plantación es de 5 m de distancia entre hileras y de 3 m entre plantas con arreglo en tresbolillo, para una densidad de 666 plantas por hectárea. Se tomaron datos de temperatura y humedad relativa con un data logger HOBO® colocado en la parcela experimental desde la primera aplicación hasta la última fecha de muestreo.

Se realizaron dos aplicaciones (la segunda a los quince días) de los plaguicidas diazinón, clorpirifos, dimetoato, malatión y permetrina en octubre de 2006. En noviembre de 2007, se aplicaron los plaguicidas spinosad y abamectina. En ambas fechas, la aplicación fue con mochila manual y con boquilla de cono hueco. Las dosis y los datos de calibración de la aplicación se muestran en el Cuadro 17.

Cuadro 17. Plaguicidas aplicados en tuna y datos de la calibración de la aplicación.

Plaguicida (nombre comercial)	Formulación % i.a. (presentación)	Dosis en 200 L de agua ¹	Volumen de agua ha ⁻¹	g o mL de i.a. ha ⁻¹	Determinación
Diazinón DIAZINÓN	25%/CE	1.0 L	1027 L	1283.8	GC-MS
Clorpirifos LORSBAN 480EM	44.5%/ CE	0.5 L	1027 L	1142.5	GC-MS
Dimetoato DIMETOAL	38.7%/ CE	1.0 L	1027 L	1987.2	GC-MS
Malatión MALATHION 1000	83.7%/ CE	1.0 L	1027 L	2149.0	GC-MS
Permetrina AMBUSH 50	48.34%/ CE	0.5 L	1027 L	1241.1	GC-MS
Abamectina AGRIMEC 1.8 CE	1.8%/ CE	331.0 mL	904 L	26.9	HPLC-UV-DAD
Spinosad SPINOACE 480	44.2%/ SC	30.0 mL	904 L	59.9	HPLC-UV-DAD

i.a.: ingrediente activo, CE: concentrado emulsionable, PH: polvo humectable, SA: solución acuosa. ¹Máxima dosis recomendada en la etiqueta.

4.4.2. Muestreo

A partir de la segunda aplicación, se realizaron los muestreos de tunas maduras, lista para consumo, a los 0, 3, 7, 14, 21 y 28 días después de la aplicación (DDA) de los insecticidas diazinón, clorpirifos, dimetoato, malatión y permetrina. Las muestras de tuna tratadas con spinosad y abamectina se colectaron a los 0, 1, 3, 7 y 14 DDA. Se tomaron tres muestras de cada plaguicida aplicado en cada una de las fechas de muestreo. Cada muestra constaba de tres tunas (500-700 g). También, se colectaron tres muestras testigos, es decir tunas a las que no se les aplicaron plaguicidas, antes de aplicar los tratamientos en ambas fechas.

Una vez colectadas, las muestras se colocaron en bolsas individuales de polietileno debidamente etiquetadas y se transportaron, en hieleras portátiles con gel refrigerante, al Laboratorio de Ecología Química de Insectos en el Colegio de Postgraduados. La preparación para la determinación de residuos consistió en trocearlas y licuarlas con el objetivo de homogeneizarlas. Enseguida se colocaron en frascos ámbar y se almacenaron a -20°C hasta la determinación de los residuos.

4.4.3. Determinación de residuos de plaguicidas

La determinación de los residuos se realizó como se describe en los Capítulos II y III (Cuadro 17). La determinación por cromatografía de gases y espectrometría de masas de diazinón, clorpirifos, dimetoato, malatión y permetrina se llevó a cabo en el laboratorio de Ecología Química de Insectos, mientras que la determinación de spinosad y abamectina por cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos se llevo a acabo en el laboratorio de Fitoquímica, ambos en el Colegio de Postgraduados.

Los datos de residuos se sometieron a análisis de regresión lineal (Fórmula 6) con el paquete estadístico SAS (V 9.1) para evaluar la disminución de los residuos de los siete plaguicidas en función del tiempo y para determinar los modelos matemáticos que describen el proceso de disipación.

$$\text{Log } y = bx + a \dots \dots \dots (6)$$

Donde y = residuos, b , pendiente, a = intercepto y x =tiempo

También se calcularon los tiempos de vida media y al 90% de reducción de los residuos con sus respectivos intervalos de confianza, los que fueron determinados con la fórmula (7):

$$\hat{y}_0 \pm t_{\alpha/2, n-2} \sqrt{MS_E \left(\frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)} \dots \dots \dots (7)$$

Donde, $t_{\alpha/2, n-2}$ = valor de tablas de t de Student con $n-2$ grados de libertad y 95% de nivel de confianza); MS_E Cuadrado medio del error,

$$S_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \dots \dots \dots (8)$$

4.4.4. Cálculo de los intervalos de seguridad

Se utilizó la metodología empleada por Timme y Frehse (1980) para el cálculo de los intervalos de predicción. Los intervalos de seguridad se

establecieron con los límites superiores de los intervalos de predicción, los que se calcularon con las fórmulas (9 y 10).

Intervalo de predicción inferior

$$\log y = ((b - (DE_b * t)) * X) + (a - (DE_a * t)) \dots\dots\dots(9)$$

Intervalo de predicción superior

$$\log y = ((b + (DE_b * t)) * X) + (a + (DE_a * t)) \dots\dots\dots(10)$$

Donde y = residuos, b = pendiente, DE_b = desviación estándar de la pendiente, X = tiempo, a = intercepto, DE_a = desviación estándar del intercepto, t = valor de tablas de t de Student de dos colas con $n-1$ grados de libertad (gl) y 95% de nivel de confianza

4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.1. Condiciones ambientales

En 2006, desde la primera aplicación hasta la última fecha de muestreo, la temperatura promedio registrada fue de 13.6°C y humedad relativa de 65%. Entre la primera y la segunda aplicación la temperatura promedio fue de 16.2°C (31 al 27 de oct.) y durante el periodo de muestreo se registró una temperatura promedio de 12.33°C (27 de oct. al 24 de nov.). Desde el 15 de noviembre al 10 de diciembre de 2007, la temperatura promedio fue de 10.1°C con humedad relativa de 63.3%, con variaciones mínimas entre los periodos de las aplicaciones y los muestreos.

4.5.2. Residuos

Los residuos de todos los plaguicidas disminuyeron continuamente a través del tiempo, aunque el comportamiento fue diferente para cada plaguicida (Cuadros 18-20). Seiber (1999) menciona después de no detectar

residuos en los muestreos, el proceso de disminución continúa, pero los métodos no son lo suficientemente sensibles para poder distinguirlo.

Similar a lo reportado en este trabajo, Ettiene *et al.* (2006) indagaron la disipación de diazinón y malatión, y reportan 8.88 y 16.12 mg kg⁻¹, respectivamente, en cebolla después de una hora de realizada la aplicación, pero en el día 13 DDA no detectaron sus residuos. Sin embargo, en tuna se encontraron residuos de estos plaguicidas hasta el día 14 DDA. La velocidad de disipación de estos plaguicidas fue rápida, lo que concuerda con Sáenz *et al.* (1995) quienes concluyen que la tasa de disminución de los residuos de malatión es más rápida comparada con la de otros organofosforados. En este sentido, Braun *et al.* (1980) reportan residuos menores a 0.39 mg kg⁻¹ de diazinón en col china, lechuga y escarola a los 7 DDA.

Szeto *et al.* (1985) estudiaron la disminución de los residuos después de dos aplicaciones de dimetoato en espárrago y encontraron residuos hasta los 38 DDA a niveles de 0.01 mg kg⁻¹. También, Ferreira *et al.* (1987) realizaron tres aplicaciones de dimetoato en durazno y encontraron residuos después de 21 días a niveles de 0.9 mg kg⁻¹. En el mismo trabajo de Ferreira *et al.* se realizaron siete aplicaciones, cada 14 días, de dimetoato en manzana y encontraron residuos de 1.4 mg kg⁻¹ de dimetoato a los 28 días después de la última aplicación.

La tercer dosis de aplicación más baja fue la clorpirifos (1.142.5 kg de ingrediente activo [i. a.] ha⁻¹, Cuadro 17), pero sus residuos fueron los únicos detectados a los 28 días después de la última aplicación, aunque los niveles estuvieron por debajo del límite de cuantificación.

Los residuos de permetrina disminuyeron rápidamente en tuna a dosis de 1.24 kg de i. a. ha⁻¹ ya que a los 21 DDA no se detectaron sus residuos (Cuadro 19). Braun *et al.* (1982) reportan 0.14 mg kg⁻¹ de residuos de permetrina en apio a los tres días DDA a dosis de 80 g de i. a. ha⁻¹. Así mismo, Ripley *et al.* (2001) afirman que se requieren tres días para que los residuos de permetrina en berenjena y tomate disminuyan sus residuos a valores de 0.1

mg kg⁻¹ a dosis de 100 g de i.a. ha⁻¹. Sin embargo, Dejonckheere *et al.* (1982) encontraron 3.8 mg kg⁻¹ de permetrina en lechuga a los 12 DDA, a dosis de 250 g de i. a. ha⁻¹.

Cuadro 18. Residuos (mg kg⁻¹) de diazinón, dimetoato, malatión y clorpirifos en tuna y porcentaje de disipación (% Dis) a través del tiempo.

DDA	Diazinón		Dimetoato		Malatión		Clorpirifos	
	Media ± DE	% Dis	Media ± DE	% Dis	Media ± DE	% Dis	Media ± DE	% Dis
0.083 [¶]	8.98 ± 0.88	0.0	14.36 ± 1.23	0.0	17.02 ± 1.233	0.0	6.70 ± 0.871	0.0
3	2.21 ± 0.27	75.4	5.66 ± 0.56	60.6	3.11 ± 0.681	81.7	3.07 ± 0.239	54.2
7	0.72 ± 0.04	92.0	1.61 ± 0.09	88.8	0.21 ± 0.098	98.8	2.10 ± 0.701	68.7
14	0.073 ± 0.01	99.2	0.99 ± 0.07	93.1	0.09 ± 0.018	99.5	1.05 ± 0.177	84.3
21	<L _Q M		0.53 ± 0.05	96.3	nd		0.15 ± 0.082	97.8
28	nd		nd		nd		<L _Q M	

[¶]Dos horas; DDA= después de la aplicación; DE= desviación estándar; nd= no detectado; <L_QM= menor al límite de cuantificación del método; n=3.

Cuadro 19. Residuos (mg kg⁻¹) de permetrina y porcentaje de disipación (% Dis) en tuna a través del tiempo.

DDA	<i>cis</i> -Permetrina		<i>Trans</i> -Permetrina		Permetrina (total)	
	Media ± DE	% Dis	Media ± DE	% Dis	Media ± DE	% Dis
0.083	3.01 ± 0.762	0.0	3.31 ± 1.012	0.0	6.32 ± 1.774	0.0
3	0.44 ± 0.191	85.4	0.43 ± 0.131	87.0	0.87 ± 0.322	86.2
7	0.11 ± 0.067	96.3	0.08 ± 0.021	97.6	0.19 ± 0.088	97.0
14	0.052 ± 0.019	98.3	<L _Q M		0.052 ± 0.019	99.2
21	nd		nd		nd	
28	nd		nd		nd	

[¶]Dos horas; DDA= después de la aplicación; DE= desviación estándar; nd= no detectado; <L_QM= menor al límite de cuantificación del método; n=3.

Los residuos de spinosad se detectaron hasta el día siete (Cuadro 20). Gao *et al.* (2007), reportan residuos de 0.0092 mg kg⁻¹ de spinosad en col china a dosis de 50 g de i. a. ha⁻¹ a los 7 DDA después de cuatro aplicaciones, y en berenjena encontraron 0.0952 mg kg⁻¹ a dosis de 75 g de i. a. ha⁻¹ en el día

cinco DDA después de dos aplicaciones. Por otro lado, Sharma *et al.* (2007), a dosis de 35 g de i. a. ha⁻¹, reportan 5.85 y 3.89 mg kg⁻¹ como depósitos iniciales de spinosad en col y coliflor, respectivamente, pero encontraron residuos sólo hasta los 10 DDA a niveles de 0.11 y 0.13 mg kg⁻¹, respectivamente.

La disminución de residuos de abamectina en tuna fue la más rápida, lo que está directamente relacionado con la dosis de aplicación ya que se aplicaron 26.5 g de i. a ha⁻¹ (la dosis más baja, Cuadro 17) y al tercer día sólo se detectaron sus residuos en una muestra por debajo del límite de cuantificación (Cuadro 19). De manera similar, en un estudio sobre la degradación de tres acaricidas llevado a cabo por Kamela *et al.* (2007) en dátiles de Arabia Saudita, reportan como depósitos iniciales de abamectina 0.09 mg kg⁻¹ los cuales disminuyeron a 0.03 (66%) y a 0.02 mg kg⁻¹ (88%) después de 7 y 14 DDA, respectivamente.

Cuadro 20. Residuos (mg kg⁻¹) de spinosad y abamectina y porcentaje de disipación (% Dis) en tuna a través del tiempo.

DDA	Espinosina A		Espinosina D		Spinosad (total)		Abamectina	
	Media ± DE	% Dis	Media ± DE	% Dis	Media ± DE	% Dis	Media ± DE	% Dis
0.083 [¶]	0.528 ± 0.044	0.0	0.202 ± 0.023	0.0	0.730±0.066	0.0	0.224±0.018	0.0
1	0.338 ± 0.010	35.9	0.166 ± 0.028	17.8	0.504±0.038	30.9	0.082±0.023	63.2
3	0.276 ± 0.072	47.8	0.032 ± 0.015	84.1	0.308±0.087	57.8	<L _Q M	
7	0.111 ± 0.020	79.0	0.022 ± 0.011	88.9	0.133±0.029	81.7	nd	
14	nd		nd		nd		nd	

[¶]Dos horas; DDA= después de la aplicación; DE= desviación estándar; nd= no detectado; <L_QM= menor al límite de cuantificación del método; n=3.

Al graficar los niveles de residuos contra el tiempo, los residuos se pueden representar por una curva de función exponencial (Figura 16), pero cuando se grafican los logaritmos de los valores de residuos contra el tiempo se obtiene una línea recta con una regresión lineal, lo que permite obtener o calcular los residuos con sus respectivos errores y desviaciones con una buena aproximación estadística (Figura 15) (Timme y Frehse, 1980). Aun cuando en

los experimentos sobre residuos de plaguicidas no se lleve a cabo el muestreo en el día de la aplicación, el antilogaritmo del intercepto provee el valor de los residuos en el tiempo cero (Timme *et al.*, 1986). En el Cuadro 21, se presentan las ecuaciones utilizadas para describir el comportamiento de los residuos de los plaguicidas en tuna.

Cuadro 21. Curvas de disipación de siete plaguicidas en tuna.

Plaguicida	Curva de disipación	R^2	DE		t (gl)
			a	b	
Diazinón	$R = 10^{-0.1460t+0.8820}$	0.9997	0.0370	0.0046	2.228 (11)
Clorpirifos	$R = 10^{-0.0698t+0.7931}$	0.9441	0.0764	0.0065	2.120 (18)
Dimetoato	$R = 10^{-0.0645t+0.9480}$	0.8867	0.0754	0.0064	2.160 (14)
Malatión	$R = 10^{-0.1639t+0.9742}$	0.8587	0.1675	0.0210	2.228 (11)
Permetrina	$R = 10^{-0.1430t+0.5225}$	0.8826	0.1314	0.0165	2.228 (11)
Spinosad	$R = 10^{-0.1044t-0.1715}$	0.9307	0.0346	0.0090	2.228 (11)
Abamectina	$R = 10^{-0.6102t-0.49196}$	0.8646	0.0493	0.0736	2.776 (5)

DE= desviación estándar. a=intercepto, b=pendiente, t = valor de tablas de t de Student de dos colas con n-1 grados de libertad (gl) y 95% de nivel de confianza (utilizado para construir los intervalos de predicción)

El parámetro T/X expresa el tiempo después del cual la concentración de los residuos ha disminuido a una fracción 1/X de la concentración inicial (Timme y Freshe, 1986). Los tiempos de vida media (T/2) y su correspondiente intervalo de confianza se presentan en el Cuadro 22 y se calcularon de las curvas de disipación del Cuadro 21. El T/2 para la mayoría de los plaguicidas no rebasó los tres días. Clorpirifos tuvo un tiempo de vida media de 4.08 días en tuna, Montemurro *et al.* (2002) evaluaron tres formulaciones de clorpirifos y encontraron que los concentrados emulsionables y los gránulos humectables disminuyeron sus residuos más rápido que los microencapsulados y obtuvieron un tiempo de vida media de 6.3 días para clorpirifos (concentrado emulsionable) en naranja. Por otro lado, Sánchez *et al.* (2005) obtuvieron un tiempo de vida media para clorpirifos de 2.34 días y de 0.29 días para malatión en guayaba, mientras que en tuna la vida media de malation fue de 1.84 días.

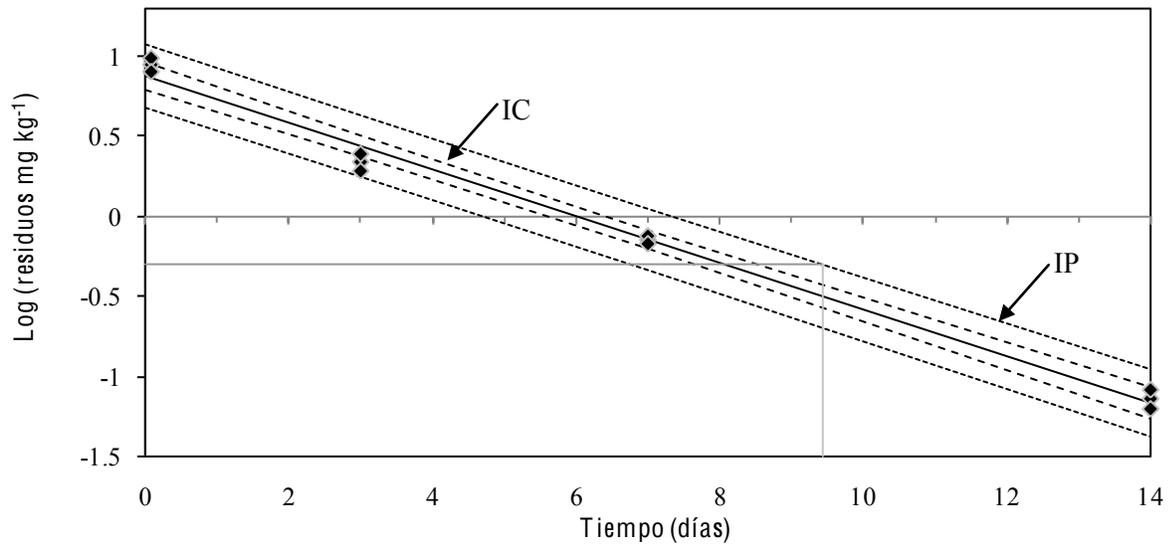


Figura 15. Curva de disipación de diazinón en tuna en función logarítmica. Las líneas discontinuas indican los intervalos de confianza (IC) y de predicción (IP); la línea vertical indica el intervalo de seguridad al LMR propuesto ($\log [0.5 \text{ mg kg}^{-1}]$, línea horizontal).

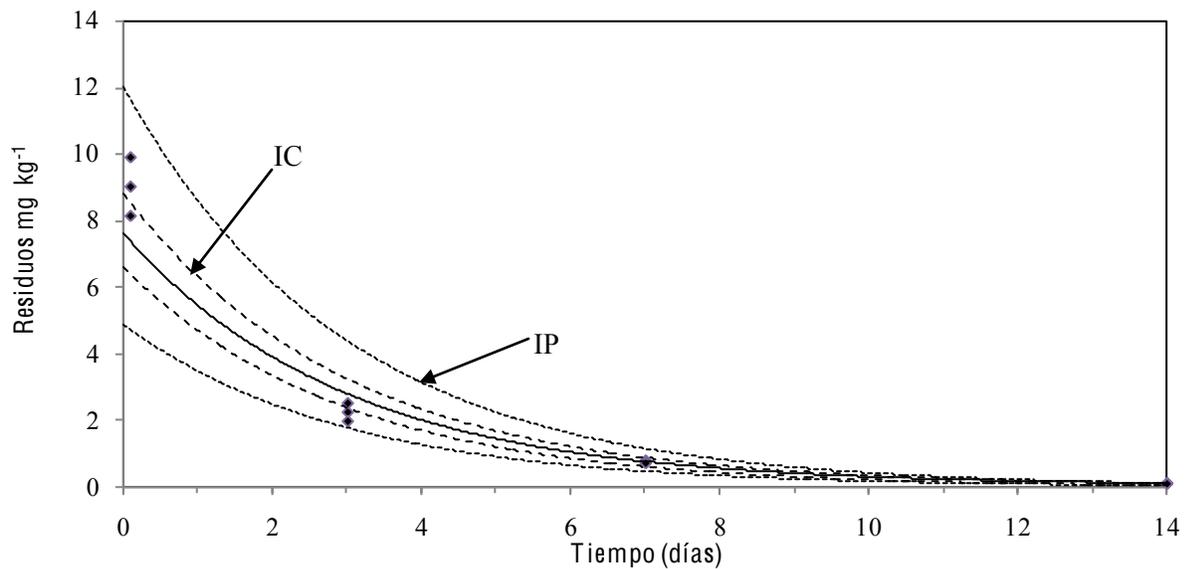


Figura 16. Curva de disipación de diazinón en tuna en función exponencial (con antilogaritmos). Las líneas discontinuas muestran los intervalos de confianza (IC) y de predicción (IP).

La disminución de los residuos de diazinón en tuna fue más rápida que la de clorpirifos. De manera contrastante, Al-Samariee *et al.* (1988) obtuvieron tasas de disipación más altas para clorpirifos que para diazinón en chile cultivado en invernadero.

Cuadro 22. Tiempos de vida media (T/2) en días y a 90% de reducción (T/10) de los siete plaguicidas en tuna a 95% de nivel de confianza.

Plaguicida	T/2 (intervalos de confianza)	T/10 (intervalos de confianza)
Diazinón	2.06 (1.60 - 2.53)	6.85 (7.22 - 6.47)
Clorpirifos	4.08 (1.59 - 7.70)	13.54 (9.57 - 19.33)
Dimetoato	4.67 (2.79 - 6.54)	15.50 (13.37 - 17.64)
Malatión	1.84 (-0.07 - 3.75)	6.10 (4.61 - 7.59)
Permetrina	2.11 (0.05 - 5.59)	6.99 (3.93 - 12.17)
Spinosad	2.88 (1.80 - 4.48)	9.58 (7.42 - 12.78)
Abamectina	0.53 (0.18 - 1.32)	1.76 (1.07 - 3.34)

4.5.3. Intervalos de seguridad

El tiempo de vida media y a 90% de reducción de residuos de plaguicidas provee información acerca de la persistencia de los plaguicidas en los cultivos, pero en la práctica no son determinantes para el establecimiento de intervalos de seguridad (IS) (Martínez *et al.*, 2003). En el Cuadro 23 se presentan los tiempos requeridos (con sus respectivos intervalos de predicción) para que los residuos alcancen niveles a los LMRs propuestos en el Cuadro 2 del Capítulo I. El IS se estableció al redondear al número inmediato superior del intervalo de predicción superior para cada plaguicida.

Clorpirifos requirió más tiempo para que sus residuos estuvieran por debajo del LMR propuesto. Por el contrario, abamectina resultó con el menor intervalo de seguridad. La CONAZA-INIF (1981) recomiendan un intervalo de seguridad de 7 días para malatión en nopal tunero, valor superior al determinado en este estudio. Por otro lado, De la Rosa y Santana (1998) fijaron un intervalo de seguridad de un día para el mismo plaguicida.

Desafortunadamente, en ambas publicaciones no se sustentan las bases de cómo establecieron esos valores.

Cuadro 23. Tiempo requerido (Valor predicho) para que los residuos de plaguicidas disminuyen a sus respectivos LMRs propuestos en tuna a 95% de nivel de confianza.

Plaguicida (LMR propuesto mg kg ⁻¹)	Valor predicho (días)	Intervalos de predicción (días)	Intervalo de seguridad propuesto (días)
Diazinón (0.5)	8.10	7.04 – 9.33	10
Clorpirifos (1.0)	11.07	7.48 – 16.29	17
Dimetoato (2.0)	10.03	6.18 – 15.97	16
Malatión (8.0)	0.43	-1.43 – 3.80	4
Permetrina (3.0)	0.32	-1.38 – 3.18	4
Spinosad (0.3)	3.37	2.21 – 5.08	5
Abamectina (0.1)	0.79	0.36 – 1.83	2

En negritas, el intervalo de predicción superior.

4.6. CONCLUSIONES

Los intervalos de seguridad propuestos de diazinón, clorpirifos, dimetoato, malatión, permetrina, spinosad y abamectina para tuna son de 10, 17, 16, 4, 4, 5 y 2 días, respectivamente.

4.7. LITERATURA CITADA

- Al-Samariee, A. I., K. A. M. Shaker y M. A. Al-Bassomy. 1988. Residue levels of three organophosphorus insecticides in sweet pepper grown in commercial greenhouses. *Pestic. Sci.* 22: 189-194.
- Braun, H. E., G. M. Ritcey, R. Frank, F. L. McEwen y B. D. Ripley. 1980. Dissipation rates of insecticides in six minor vegetable crops grown on organic soils in Ontario, Canada. *Pestic. Sci.* 11(6): 605-616.
- Braun, H. E., G. M. Ritcey, B. D. Ripley, F. L. McEwen y R. Frank. 1982. Studies of the disappearance of nine pesticides on celery and lettuce grown on muck soils in Ontario, 1977-1980. *Pestic. Sci.* 13(2): 119-128.

- Cabras, P. 2003. Pesticides: toxicology and residues in food. *In: Food safety: contaminants and toxins*. D'Mello, J. P. F. (ed). CABI Publishing. Wallingford, UK. pp. 91-124.
- CEC (Commission of the European Communities). 1997. Calculation of maximum residue levels and safety intervals. CEC. Directorate General for Agriculture VI BII-1, 7039/VI/95 EN (1997). 13 p. [En línea] http://europa.eu.int/comm/food/fs/ph_ps/pest/calculation.pdf Última consulta: 30 de junio de 2008.
- CONAZA-INIF (Comisión Nacional de Zonas Áridas-Instituto Nacional Investigaciones Forestales). 1981. El nopal. CONAZA-INIF. México, D. F. 85 p.
- Coscolla, R. 1993. Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales. Mundi-Prensa. Madrid, España. 205 p.
- Dejonckheere, W., R. Verstraeten, W. Steurbaut, G. Melkebeke y R. H. Kips. 1982. Permethrin and deltamethrin residues on lettuce. *Pestic Sci.* 13(4): 351-356.
- De la Rosa H., J. P. y D. Santana A. 1998. El nopal: usos, manejo agronómico y costos de producción en México. UACH. CIESTAAM. Chapingo, México. 182 p.
- Ettiene, G., S. Ortega, J. Sepúlveda, D. Medina, I. Buscema y L. Sandoval. 2006. Dissipation of organophosphorus pesticides in green onion (*Allium fistulosum* L), cultivated in forced system called "Barbacoas". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76: 415-421.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2002. Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed. FAO. Rome, Italy. 192 p.
- Ferreira, J. R., M. M. Falcao y A. Tainha. 1987. Residues of dimethoate and omethoate in peaches and apples following repeated applications of dimethoate. *J. Agric. Food Chem.* 35(4): 506-508.
- Frehse H. y H. F. Walter. 1995. The behaviour of pesticide residues in fruits and vegetables: evaluation by decline curves. *In Residuos de plaguicidas'94*. Valverde G., A. y A. Rodríguez F. A. (eds). Instituto de Estudios Almerienses, Almería, España. pp 35-85.
- Gao, R., J. Dong, W. Zhang y W. L. Chen. 2007. Dietary risk assessment of spinosad in China. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 49: 31-42.
- Harris, C. A. y A. R. C. Hill. 2004. Variability of residues in unprocessed food items and its impact on consumer risk assessment. *In: Pesticide toxicology and international regulation*. Marrs, T. C., and B. Ballantyne (ed). John Wiley & Sons. Chichester, England. pp 1-23.
- Kamela, A., S. Al-Dosaryb, S. Ibrahim y M. A. Ahmed. 2007. Degradation of the acaricides abamectin, flufenoxuron and amitraz on Saudi Arabian dates. *Food Chemistry.* 100(4): 1590-1593.
- Martínez G., M., M. D. Gil G., J. A. Rodríguez L., T. López L. y J. L. Martínez V. 2003. Dissipation of pyrethroid residues in peppers, zucchinis, and green

- beans exposed to field treatments in greenhouses: evaluation by decline curves. *J. Agric. Food Chem.* 51(19): 5745-5751.
- Montemurro, N., F. Grieco, G. Lacertosa, y A. Visconti. 2002. Chlorpyrifos decline curves and residue levels from different commercial formulations applied to oranges. *J. Agric. Food Chem.* 50(21): 5975-5980.
- Ripley, B. D., G. M. Ritcey, C. R. Harris, M. A. Denomme y P. D. Brown. 2001. Pyrethroid insecticide residues on vegetable crops. *Pest Manag. Sci.* 57(8): 683-687.
- Sáenz B., C., J. Sanz A., M. Plaza M. y M. Pérez C. 1995. Evaluation of the decay of malathion, dichlofluanid and fenitrothion pesticides in apple samples, using gas chromatography. *Food Chemimy.* 52: 305-309.
- Sánchez, J., G. Ettiene, I. Buscema y D. Medina. 2005. Persistencia de los insecticidas organofosforados malathion y chlorpiryphos en guayaba (*Psidium guajava* L.). *Rev. Fac. Agron (LUZ).* 22: 62-71.
- Seiber, J. N. 1999. The analytical approach. *In: Pesticide residues in food: methods, techniques, and regulations.* Fong, W. G., H. A. Moye, J. N. Seiber, y J. P. Toth (ed). John Wiley & Sons. New York, USA. pp. 1-16.
- Sharma, A., A. Srivastava, B. Ram, y P. C. Srivastava. 2007. Dissipation behaviour of spinosad insecticide in soil, cabbage and cauliflower under subtropical conditions. *Pest Manag Sci.* 63:1141-1145.
- Szeto, S. Y., R. S.Vernon y M. J. Brown. 1985. Degradation of dimethoate and pirimicarb in asparagus. *J. Agric. Food Chem.* 33(4): 763-767.
- Timme, G.; y Frehse, H. 1980. Statistical Interpretation of the degradational behaviour of pesticide residues I. *Planzenschutz-Nachrichten Bayer* 33, 47-60.
- Timme, G.; Frehse, H.; Laska, V. 1986. Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. *Planzenschutz-Nachrichten Bayer.* 39: 187-203.
- Walter, H. F.; Frehse, H.; Timme, G. 1993. Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues III. Extension of the formal description of degradation. *Planzenschutz-Nachrichten Bayer.* 46: 265-288.

CONCLUSIONES GENERALES

Los límites máximos de residuos (LMRs) propuestos de malatión, clorpirifos, permetrina, diazinon, dimetoato, spinosad y abamectina en tuna son 8.0, 1.0, 3.0, 0.5, 2.0, 0.3 y 0.1 mg kg⁻¹, respectivamente. Estos LMRs pueden ser adoptados para tuna, ya que los niveles de exposición a estos plaguicidas no excedieron las ingestas diarias aceptables respectivas, por lo que no representan ningún riesgo para la salud de los mexicanos por su ingesta a través de los alimentos.

Los métodos de análisis de residuos de plaguicidas fueron eficientes, reproducibles y lo suficientemente sensibles para la determinación de éstos en tuna y se pueden utilizar para monitorearlos de manera rutinaria. La parámetros de validación estuvieron dentro de los valores de referencia aceptables y los límites de cuantificación de los métodos fueron menores que los LMRs propuestos.

Los intervalos de seguridad propuestos de malatión, clorpirifos, permetrina, diazinon, dimetoato, spinosad y abamectina para tuna son de 4, 17, 4, 10, 16, 5 y 2 días, respectivamente. Estos plaguicidas se pueden utilizar en tuna de acuerdo con lineamientos establecidos en los programas de buenas prácticas agrícolas.