

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas

Determinación de residuales pesticidas organoclorados en las especies *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum* y *Thymus vulgaris* a través de métodos cromatográficos y espectrofotométricos

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero Químico

Presentado por:

Nohelya Cristina Borrero Arias

Kevin David Castillo Bajaña

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2021

DEDICATORIA

Este proyecto va dedicado a Dios y a mis amigos incondicionales de la universidad que me acompañaron en esta transformadora etapa tanto en los momentos más difíciles como en los más felices y memorables. A Jocelyn, una de mis mejores amigas del colegio quien nunca dudó en abrirme las puertas de su hogar para escucharme y darme consejos que me permitieron lidiar con muchas incertidumbres en mi vida. A mi mamá Cristina y mi abuela Haydee por enseñarme a través del ejemplo la importancia de la disciplina, constancia y el sentido de la responsabilidad para cumplir mis sueños. A mis dos ángeles del cielo: a mi abuelo materno y a mi tío paterno que con paciencia y cariño me enseñaron la magia de las matemáticas, sus enseñanzas permanecerán vivas en mi mente y corazón. A mis líderes y mentores, que con sus críticas constructivas y pasión por enseñar moldearon a la persona y profesional en que me he convertido.

Nohelya Cristina Borrero Arias

DEDICATORIA

Este proyecto se lo dedico a Dios por haberlo conocido al inicio de esta etapa siendo mi guía en todo momento. A mi familia por el apoyo incondicional que me han brindado y su ayuda a poder crecer como persona. A mi angelito en el cielo Teresa Lino cuya felicidad en este instante sería indescriptible. A mis amistades y hermanos en Cristo por sus consejos, direcciones y oración para perseverar en cada una de las dificultades que se presentaron.

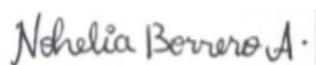
Kevin David Castillo Bajaña

AGRADECIMIENTOS

Nuestros sinceros agradecimientos a la Dra. Patricia Manzano Santana, PhD, que con sus conocimientos y experticia en su área nos dio guía para concluir exitosamente este proyecto integrador. A la MSc. Nadia Flores por aportarnos con ideas durante la documentación del proyecto.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución. Nohelya Cristina Borrero Arias y Kevin David Castillo Bajaña dan consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”



Nohelya Cristina
Borrero Arias



Kevin David Castillo
Bajaña

EVALUADORES

M.Sc. Nadia Magaly Flores Manrique

PROFESOR DE LA MATERIA

PhD. Patricia Isabel Manzano Santana

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

El Ecuador constituye uno de los países con una flora muy biodiversa donde el 90% de las plantas medicinales consumidas se obtienen en el campo. Sin embargo, estas tienen un sistema de cosecha que emplean pesticidas sintéticos cuyo uso desmedido o contaminación cruzada provoca una acumulación de residuos que afectan directamente su calidad. El presente proyecto propone un protocolo para la identificación cualitativa del pesticida bifentrina en las especies medicinales *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum* y *Thymus vulgaris* mediante técnicas cromatográficas.

El estudio se inicia con la selección, colecta y extracción selectiva del compuesto bifentrina en cada una de las especies mencionadas para su posterior tamiz cualitativo. Con la técnica de cromatografía de capa fina (TLC), a través del revelado con nitrato de plata, se observó una mancha negra en las cromatoplasmas de tomillo y albahaca y una leve mancha grisácea en la cromatoplasma de la albahaca; y, con la técnica de CG-MS/MS realizado por un laboratorio externo acreditado por ISO/IEC Standard 17025:2017 y la Accreditation Criteria for Testing Laboratories, se reportó ausencia de bifentrina en las especies *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* con una concentración menor a 0.01 mg/kg, inferior al límite de cuantificación y presencia de bifentrina en la especie *Ocimum basilicum* con una concentración de 0.02 mg/kg superior a este límite de cuantificación.

Como se puede corroborar, la estrategia de identificación de bifentrina mediante el protocolo de extracción y detección por técnicas cromatográficas proporciona una opción sencilla para una referencia cualitativa de presencia de pesticida en las plantas medicinales del estudio propuesto.

Palabras Clave: *Protocolo, Identificación, Pesticida, Cromatografía de Capa Fina*

ABSTRACT

*Ecuador is one of the countries with a very biodiverse flora where 90% of the medicinal plants consumed are obtained in the field. However, these have a harvesting system that uses synthetic pesticides whose excessive use or cross-contamination causes an accumulation of residues that directly affects their quality. This project proposes a protocol for the qualitative identification of the pesticide bifenthrin in the medicinal species *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum* and *Thymus vulgaris* using chromatographic techniques.*

*The study begins with the selection, collection, and selective extraction of the bifenthrin compound in the species mentioned above for its subsequent qualitative screening. With the thin layer chromatography (TLC) technique, through development with silver nitrate, a black spot was observed in the chromatoplates of the samples *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* and a grayish spot in the basil sample. Through the GC-MS/MS technique carried out by an external laboratory accredited by ISO/IEC Standard 17025:2017 and the Accreditation Criteria for Testing Laboratories, the absence of bifenthrin was reported in the species *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* with a concentration lower than 0.01 mg/kg and lower than the limit of quantification and presence of bifenthrin in the species *Ocimum basilicum* with a concentration of 0.02 mg/kg higher than its limit of quantification.*

As can be confirmed, the bifenthrin identification strategy using the developed protocol for extraction and detection by chromatographic techniques provides a simple option for a qualitative reference of the presence of pesticides in the medicinal plants of the proposed study.

Keywords: Protocol, Identification, Pesticide, Thin Layer Chromatography

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ABSTRACT.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS	V
SIMBOLOGÍA.....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.....	9
1.2 Justificación del problema.....	10
1.3 Objetivos.....	12
1.3.1 Objetivo General	12
1.3.2 Objetivos Específicos	12
1.4 Marco teórico.....	13
1.4.1 Pesticidas.....	13
1.4.2 Estado del arte de métodos de extracción y detección de pesticidas.....	16
1.4.3 Especies de plantas medicinales del estudio.....	21
2. Metodología	23
2.1 Pre-experimentación	23
2.1.1 Investigación preliminar	23
2.1.2 Elección de la metodología.....	24
2.1.3 Selección y recolección de las plantas medicinales	24
2.1.4 Preparación de la muestra.....	25
2.2 Experimentación.....	26
2.2.1 Extracción	26
2.2.2 Caracterización	27
3. Resultados y Análisis.....	30
3.1 Análisis en la etapa preliminar	30

3.2	Resultados de la caracterización.....	30
3.2.1	Análisis de resultados de la identificación de la bifentrina mediante Cromatografía de Capa Fina	32
3.2.2	Análisis de resultados de identificación de la bifentrina mediante Espectrofotometría UV-Vis	33
3.2.3	Análisis resultados de identificación de bifentrina mediante GC -MS/MS desarrollados en el laboratorio externo	34
4.	Conclusiones Y Recomendaciones.....	35
4.1	Conclusiones.....	35
4.2	Recomendaciones	36
	APÉNDICE A.....	45
	APENDICE B. FOTOS EXPERIMENTACIÓN.....	46
	APENDICE C. INFORME DE RESULTADOS DE LABORATORIO EXTERNO	49

ABREVIATURAS

LMR	Límite Máximo Residual
APA	Agencia de Protección Ambiental
APS	Amina Primaria Secundaria
AAM	Administración de alimentos y Medicamentos
CG	Cromatografía de Gases
CCF	Cromatografía de Capa Fina
COP	Compuestos Orgánicos Persistentes
d-SPE	Fase sólida dispersiva
DER	Desviación Estándar Relativa
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
EM	Espectrometría de Masas
HOMO	Orbital molecular ocupado de mayor energía
LUMO	Orbital molecular ocupado de menor energía
LDD	Límites de Detección
OMS	Organización Mundial de la Salud
QuEChERS	Rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro
ISO	Organización Internacional para estandarización

SIMBOLOGÍA

HCl	Ácido Clorhídrico.
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de Metileno
°C	Celsius
R _f	Factor de Retención
g	Gramo
I ₀	Intensidad de la luz incidente
I	Intensidad de la luz que emerge de la celda
L	Litro
kg	Kilogramo
min	Minutos
mg	Miligramo
mL	Mililitro
Nm	Nanómetro
AgNO ₃	Nitrato de Plata
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
Na ₂ SO ₄	Sulfato de Sodio
s	Segundos

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Requerimientos técnicos de fabricación de estándar bifentrina.....	15
Tabla 1-2: Nivel Máximo Residual de Bifentrina en diferentes productos agrícolas.....	16
Tabla 2-1:Cantidad de muestra empleados en la extracción	26
Tabla 2-2: Cantidades en mililitros de los diferentes reactivos para la extracción L-L	27
Tabla 3-1: Cuadro comparativo entre las 3 metodologías de identificación	34

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Estructura química de los pesticidas organoclorados.....	13
Figura 1-2: Estructura química de los sintéticos piretroides.....	14
Figura 1-3: Principio de uso de la cromatografía de capa fina.....	21
Figura 1-4: Aspecto fisiológico de <i>Origanum vulgare</i>	21
Figura 1-5: Aspecto fisiológico de <i>Ocimum basilicum</i> L.....	22
Figura 1-6: Aspecto fisiológico de <i>Thymus Vulgaris</i> L.....	22
Figura 2-1: Diagrama de Etapas de la Metodología.....	23
Figura 2-2: Ubicación de las especies <i>Origanum vulgare</i> y <i>Ocimum basilicum</i>	25
Figura 2-3: Ubicación de la especie <i>Thymus vulgaris</i>	25
Figura 2-4: Sistema de Cromatografía de capa fina.....	28
Figura 3-1: Cromatoplaça y Espectrograma UV-Vis: Albahaca, Tomillo, Orégano y el estándar de bifentrina.....	31

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Desde los años 70, con el crecimiento acelerado en la producción y uso de pesticidas químicos en la agricultura, sus efectos tóxicos han generado un impacto negativo en el ambiente, seguridad alimentaria y salud humana. Es el caso de los productos químicos catalogados como contaminantes orgánicos persistentes (COP), los cuales no se degradan fácilmente y se transportan a largas distancias a través del aire y el agua (Chandra et al., 2021).

El control de pesticidas en alimentos se basa en las tolerancias alimentarias o los límites máximos de residuos (LMR), establecidos por la Unión Europea (UE), el Codex Alimentarius (CA) y otras organizaciones reguladoras como la Agencia de Protección Ambiental (EPA, EE. UU) (Perestrelo et al., 2019). Cabe recalcar que un límite máximo de residuos es definido como el nivel más alto de residuales de pesticidas legalmente permitido en cierto alimento (Chandra et al., 2021). Sin embargo, estos límites de seguridad pueden subestimar un riesgo real para la salud de los consumidores en caso de no ser detectado apropiadamente. La acumulación y el exceso de residuos de pesticidas que supera mínimamente el máximo permitido puede generar efectos tóxicos y alergénicos en la salud de los consumidores (Coyago & Lozano et al., 2020).

En este sentido, la determinación de residuos de plaguicidas es muy importante para monitorear y analizar con precisión los niveles residuales en una compleja matriz como el de las hierbas y/o plantas medicinales, las cuales serán el enfoque principal de análisis en este proyecto y constan de compuestos fenólicos, pigmentos, azúcares, flavonoides y lípidos; componentes que, por su naturaleza, pueden influir en las propiedades físicas y químicas del plaguicida y exhibir características cromatográficas similares a estos provocando graves efectos de matriz (Tripathy et al., 2017).

Otros factores que indirectamente contribuyen a la presencia de residuales de plaguicidas es el modo de aplicación, la cantidad, sus propiedades fisicoquímicas y bioquímicas, su grado de solubilidad en agua y la etapa de desarrollo de la planta. Los contaminantes orgánicos persistentes (COP) como los organoclorados, se

caracterizan por su baja solubilidad y resistencia a la degradación ambiental. Además, se volatilizan del suelo seco, se liberan a la atmósfera y regresan al agua o al suelo como precipitación húmeda o seca para finalmente ser absorbidos por las plantas a través de las raíces y la superficie de las hojas (Sharma et al., 2019).

La mayoría de los métodos convencionales de determinación de residuos pesticidas no detallan un procedimiento con reactivos y solventes accesibles que permita aislar el plaguicida acorde a una matriz dada. Adicionalmente, hay una gran variedad de plaguicidas disponibles, y es muy difícil detectarlos todos con un solo método analítico debido a las diferencias en las propiedades fisicoquímicas (Hassaan et al., 2020).

Una opción rápida para la determinación de estos residuales es el uso del método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe por sus siglas en inglés); sin embargo, la posibilidad en adquirirlo a nivel nacional es complejo ya que no hay proveedores nacionales que proporcionen el kit comercial. Es por ello que en este proyecto se propone como alternativa para aislar los diferentes pesticidas, un protocolo de extracción y detección cualitativa por métodos cromatográficos que requiera del uso de reactivos accesibles para cualquier laboratorio y que proporcione resultados inmediatos.

1.2 Justificación del problema

Ecuador constituye uno de los países más biodiversos del planeta, y se estima que más del 90% de las plantas medicinales consumidas se extraen directamente del campo y hace uso de sistemas de procesamiento, recolección y transporte rudimentarios que no se adhieren a buenas prácticas agrícolas. Según el Banco Central del Ecuador durante el año 2011, las exportaciones de productos herbáceos y plantas medicinales alcanzaron un valor total de 13.8 millones de USD mientras que para el año 2016 estas exportaciones ascendieron a 71,3 millones de USD, y, para el año 2021 se proyecta un crecimiento del mercado de ventas al 8,5%. Siendo Estados Unidos, el principal destino de exportación con una participación del 62.29%, seguido de Italia con 9.13% de participación, Alemania 9.00%, Argentina 8.22% y Francia con una participación del 3.32% (Ulloa, 2016).

Por otro lado, el impacto a la agricultura convencional por el uso de pesticidas sintéticos en la producción de alimentos a gran escala ha ocasionado un avance significativo en el proceso agrícola (Pérez, Leyva & Gómez et al., 2018). Sin embargo, el efecto ambiental y la acumulación de los residuos en la cadena alimentaria son inevitables ya que muchas de las sustancias que se utilizan en tierras agrícolas y en la producción de cultivos consta de compuestos de pesticidas organoclorados persistentes que perduran en los ecosistemas durante un período prolongado de tiempo y tienen un nivel de toxicidad considerable. (Ravindran, Megha, & Sreedev et al., 2016).

Los plaguicidas organoclorados se caracterizan por poseer componentes contaminantes que generan un efecto residual a largo plazo en el medio ambiente (Loro & Clasen, 2021). Debido a su presencia en una gran variedad de especies de plantas y su uso en diversos sectores como en el agrícola, el presente estudio se enfocará exclusivamente a profundizar la determinación de residuos plaguicidas organoclorados en las plantas *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum* y *Thymus vulgaris*.

Estas especies se emplean para la elaboración de extractos, aceites esenciales y como materia prima de productos cosméticos, farmacéuticos, nutraceúticos, entre otros (Huanca & Mamani, 2020). Además, tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de una amplia gama de microorganismos patógenos (García, Pabón & Rodríguez., 2019). También se ha demostrado que sus componentes principales tienen efectos inmunomoduladores en mamíferos y constituye una fuente de antioxidantes que contrarrestan la acción de los radicales libres, lo cual se asocia a la prevención y tratamiento de diversas patologías (Gastaldi et al., 2016).

Otro problema asociado a la presencia de residuos de plaguicidas en plantas es la inhibición de las propiedades bioactivas, ya que la acumulación de los diferentes compuestos orgánicos volátiles genera una elevada concentración que puede superar el máximo permitido representando un riesgo para la salud del consumidor. (Chandra et al., 2021). Por ende, es fundamental monitorear los niveles de residuales de pesticidas en una matriz compleja a través del uso de técnicas cromatográficas para la determinación de residuos de plaguicidas.

Para aprovechar las propiedades bioactivas de dichas plantas, en este proyecto se propone un protocolo que brinde una alternativa de uso de solventes accesibles dada una matriz heterogénea planta-multi-residual de plaguicidas. Además, se encaminará a una estrategia que permita llevar a cabo un análisis de residuales de pesticidas partiendo desde la modificación y optimización de la preparación de las muestras en conjunto con la introducción de técnicas de detección en las plantas medicinales que carecen de estudios analíticos a razón de que las metodologías tradicionales no describen las condiciones reales de experimentación como la variabilidad en las muestras de diferentes condiciones geográficas (Heshmati et al., 2021).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

- Desarrollar un protocolo para la extracción e identificación de residuales pesticidas organoclorados presentes en las especies *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum* y *Thymus vulgaris* a través de las técnicas cromatográficas y espectrofotométrico.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Realizar un pretratamiento de muestras a través de la técnica de extracción líquido – líquido para la reducción de interferencias en los extractos de las especies *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum* y *Thymus vulgaris*.
- Analizar por método de cromatografía de capa fina la presencia de bifentrina adaptado a una matriz de plantas medicinales para la identificación cualitativa del pesticida que contiene grupos haloalquilos.
- Identificar la presencia de bifentrina mediante la comparación de las cromatoplasmas, espectros cromatográficos y colorimétricos de los extractos de las plantas medicinales.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Pesticidas

1.4.1.1 Antecedentes

El uso de plaguicidas en la agricultura es un requerimiento necesario para mejorar la cantidad de alimentos producidos debido al rápido crecimiento de la población y para la prevención de enfermedades. Actualmente, diversas organizaciones como la EPA y la FDA han establecido regulaciones que asignan un límite máximo permitido de residual de pesticida (Chen et al., 2021). La clasificación de pesticidas puede enmarcarse acorde a su naturaleza, su toxicidad y estructura química. En el presente estudio se perfila la clasificación acorde a su naturaleza sintética y su estructura química donde están los pesticidas organofosforados, organoclorados y los sintéticos piretroides (Hassaan et al., 2020).

1.4.1.2 Pesticidas Organoclorados

Los plaguicidas organoclorados se caracterizan por poseer componentes contaminantes orgánicos tenaces y persistentes durante largos períodos de tiempo teniendo un efecto residual a largo plazo en el medio ambiente (Loro & Clasen, 2021). A raíz de ello y de la adherencia a diferentes superficies, denotan un factor de bioacumulación perjudicial en la cadena alimentaria. Su estructura química correspondiente a la de los hidrocarburos clorados le brinda una alta estabilidad física y química, insolubilidad en agua y alta solubilidad en disolventes orgánicos. Estas cualidades le proporcionan resistencia en el ambiente y una baja biodegradabilidad. Como ejemplos de estos pesticidas podemos nombrar al DDT, endosulfán y bifentrina (Moreno, Logroño & Zambrano et al., 2020). En la figura 1-1 se presentan algunas estructuras características de este grupo de pesticidas.

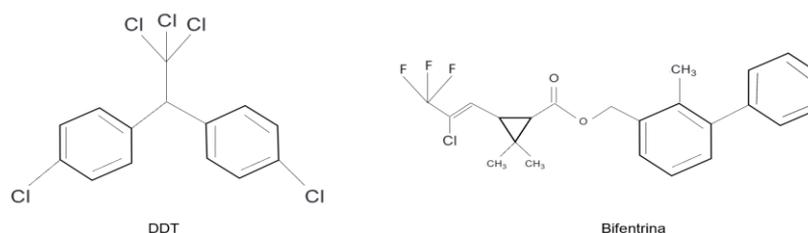


Figura 1-1: Estructura química de los pesticidas organoclorados

1.4.1.3 Pesticidas Organofosforados

Los plaguicidas organofosforados son compuestos con estructura química derivada del ácido fosfórico. Sus propiedades fisicoquímicas varían en función de su estructura, sin embargo, las que predominan son su solubilidad en agua, estabilidad térmica, presión de vapor, entre otras. Además, estos plaguicidas se descomponen con mayor facilidad, por lo que son menos persistentes en el ambiente y poseen una alta toxicidad generando una alteración al sistema nervioso de los insectos y plagas de las diferentes cosechas agrícolas (Jaramillo et al., 2016).

1.4.1.4 Sintéticos Piretroides

Los piretroides sintéticos son ésteres carboxílicos que se caracterizan por tener una mayor hidrofobicidad, baja solubilidad en agua y alta capacidad de adsorción (Eljarrat, 2020). Aunque son análogos de las piretrinas, su producción ha implicado amplias modificaciones químicas que las hacen altamente tóxicas y menos degradables en el medio ambiente. Los piretroides sintéticos son uno de los plaguicidas más utilizados en la agricultura, la ciencia veterinaria, el paisajismo urbano, los hogares y los jardines, lo que ha aumentado su presencia en el medio ambiente (Zhan et al., 2020).

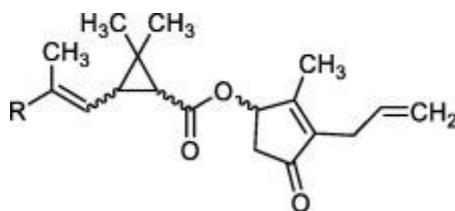


Figura 1-2: Estructura química de los sintéticos piretroides [Hassaan, 2020]

Los piretroides se agrupan en dos clases, Tipo I y Tipo II, según las propiedades toxicológicas y físicas. Los piretroides de tipo I son derivados de la piretrina que no tienen un grupo ciano y los piretroides de tipo II tienen un grupo ciano y causan cloreoatetosis y salivación (Hassaan, 2020). Una vez liberados los tratamientos, su principal mecanismo de acción sobre los organismos implica la interferencia en el sistema nervioso central, generando una interrupción en la transmisión de los impulsos nerviosos entre las células. Actualmente, los piretroides se aplican mediante

tratamientos de baño utilizando dosis de producto comercial de $0,3 \text{ mL m}^{-3}$ (dosis de principio activo de $15 \mu\text{g L}^{-1}$) para cipermetrina (Betamax®) (Eljarrat, 2020).

1.4.1.5 Bifentrina

La bifentrina es compuesto organoclorado de estructura piretroide que posee una amplia actividad como insecticida y acaricida, elimina las plagas por contacto o ingestión afectando al sistema nervioso de los insectos. Posee un peso molecular de 422.9 g/mol , una presión de vapor de 1.8 mm Hg a 25°C , una solubilidad baja en el agua de $5.1 \times 10^{-3} \text{ mg/L}$. Su punto de fusión está entre 65 a 70°C y se evapora en un rango de temperatura de 215 a 225°C . (Rivera, 2021). La bifentrina al pertenecer a los piretroides sintéticos (piretroides Tipo I o piretrinas sintéticas que no contienen el grupo Ciano) comparte las siguientes características: posee baja presión de vapor y alto peso molecular, es no iónico y extremadamente hidrofóbico en condiciones neutras (Sandoval et al., 2018).

En la tabla 1-1 se presentan datos por la Organización Mundial de la Salud donde detallan características adicionales del pesticida.

Tabla 1-1. Requerimientos técnicos de fabricación de estándar bifentrina [World Health Organization, 2012]

Porcentajes de pureza para una muestra estándar del pesticida.	95,79 al 98,54%
Longitud de detección UV	245 - 254 nm

En este sentido, la bifentrina fue clasificado como un insecticida con toxicidad Clase II por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Wu et al., 2020). Es por ello que ha ido en aumento la conciencia sobre los residuos de plaguicidas en las matrices de cultivos a través del control de su nivel residual (Ramasubramanian, & Paramasivam et al., 2020). El Codex Alimentarius establece la concentración máxima de bifentrina acorde al tipo de producto agrícola que se presenta en la tabla 1-2:

Tabla 1-2: Nivel Máximo Residual de Bifentrina en diferentes productos agrícolas [FAO, 2016]

Producto agrícola	Límite Máximo Residual
Frutos cítricos	0,05 mg/kg
Forraje seco de maíz	15 mg/kg
Germen de trigo	1,00 mg/kg
Arvejas, vainas y semillas carnosas	0,90 mg/kg
Heno de arvejas	0,70 mg/kg
Raíces y Tubérculos	0,05 mg/kg
Maíz	0,05 mg/kg
Tomate	0,30 mg/kg
Trigo	0,50 mg/kg
Cacao	0,10 mg/kg
Albahaca	0,10 mg/kg
Tomillo	0,05 mg/kg

Los estrictos niveles de residuos de concentraciones de pesticidas establecidos por la Regulación de la Unión Europea No. 396/2005 en hierbas como *Origanum vulgare* en la mayoría de los casos son iguales a 0,01 mg/kg. Sin embargo, no hay suficientes datos e investigaciones sobre residuos de plaguicidas en varias especies de hierbas debido a la complejidad de la matriz de tales productos (Drabova et al., 2019).

1.4.2 Estado del arte de métodos de extracción y detección de pesticidas

Los métodos analíticos para analizar residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas consisten generalmente en la extracción del analito de la matriz de la muestra, la purificación para la eliminación de interferencias presentes, la preconcentración de los analitos y, finalmente, el análisis instrumental. Cada procedimiento analítico se elige de acuerdo con la estructura química del plaguicida y la naturaleza de la matriz (Huérfano & Guerrero, 2018).

1.4.2.1 Métodos Extractivos

1.4.2.1.1 Extracción Líquido – Líquido

La técnica de extracción líquido líquido es una operación de transferencia de materia que se fundamenta en la distribución del soluto entre la fase acuosa y orgánica que cuando se encuentran en contacto permite la separación de compuestos de tal manera que se aproveche la diferencia de solubilidad. Los factores que permitan una extracción eficiente dependen de la afinidad del solvente con el soluto a extraer, además de la relación de volúmenes entre las dos fases, la cantidad de extracciones por agotamiento y de la solubilización del soluto en la fase orgánica. Cuando ambas fases entran en contacto y el soluto se ha repartido, la fase donde se encuentra el solvente y soluto se lo considera extracto, mientras que la fase donde se ha extraído el soluto, teniendo una concentración menor, se la considera como refinado (Pekel, et al.,2020).

1.4.2.1.2 Extracción Fase Sólida

La técnica de extracción en fase sólida consiste en la retención del analito de interés presente en la muestra a través de un cartucho o soporte sólido, que contiene un relleno adsorbente donde extrae selectivamente el componente deseado, desechando todo compuesto que puede generar interferencia en el análisis (Campoverde & Iturralde et al., 2020). En esta extracción se prepara el cartucho de tal manera que tenga interacción con el analito, luego se aplican lavados con los que se elimina las impurezas y finalmente se eluye el analito de interés de la columna adsorbente. Este paso siempre se lo considera como pretratamiento a la caracterización debido a que ayuda a concentrar los compuestos de interés en las muestras de estudio (Muñiz et al., 2019).

1.4.2.1.3 QuEChERS o Extracción Fase sólida dispersiva

La metodología comercial denominada QuEChERS es una técnica que involucra dos etapas fundamentales: la etapa de aislamiento o extracción simple del analito empleando un solvente y la etapa de limpieza de la muestra usando la

extracción en fase sólida por dispersión con sales donde eliminan las interferencias y captan el plaguicida. Las sales que se emplean en esta técnica son el sulfato de magnesio que elimina el exceso de agua; el cloruro de sodio, que favorece la extracción con el solvente orgánico, la amina primaria o secundaria denominada APS que elimina los ácidos grasos y orgánicos y el adsorbente C18 que separa las interferencias no polares (Betancourt, Ossa & Taborda, 2021). La técnica tiene como objetivo preparar la muestra acorde a las condiciones de identificación del pesticida.

1.4.2.1.4 Técnicas de microextracción

Las técnicas de microextracción se basan en un análisis cuantitativo a menor escala, donde se genera una extracción del analito empleando pequeñas porciones de fase extractante en contacto con la muestra. Esta técnica a diferencia de las metodologías de extracción comunes, no consiguen un aislamiento íntegro de los analitos de interés ocasionando una dependencia en el uso de métodos de caracterización y detección automatizados con una instrumentación analítica particular (Ronco, Gagliardi & Castells et al., 2020).

1.4.2.2 Métodos de detección

1.4.2.2.1 Espectrofotometría ultravioleta visible (UV-Vis)

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que mide la absorbancia o transmitancia de la luz mediante un espectrofotómetro, que dirige una fuente de luz hacia la muestra, y un detector en el lado opuesto que registra la luz transmitida. La mayoría de los espectrofotómetros tienen un rango de longitud de onda de 200 a 1100 nm. A nivel molecular, la espectroscopía UV-visible se basa en transiciones electrónicas de moléculas orgánicas que absorben luz excitando electrones desde un orbital de menor energía (orbital molecular ocupado de mayor energía, "HOMO" por sus siglas en inglés) a un orbital desocupado de mayor energía (orbital molecular desocupado de menor energía, "LUMO" por sus siglas en inglés) (Rocha et al., 2018).

Este proceso puede ser descrito por la Ley de Beer-Lambert que relaciona la intensidad de la luz incidente (I_0) en el frente de una celda de longitud, L , (en centímetros) con la intensidad de la luz (I) que emerge de la celda. Es decir,

expresa la relación entre absorbancia de luz monocromática (de longitud de onda fija) y concentración de un cromóforo en solución y se expresa formalmente en siguiente ecuación:

$$\log_{10}(I_0 / I) = -\log_{10}(\% T / 100\%) = e c L = A$$

Tal fórmula se cumple para soluciones diluidas a causa de fenómenos de dispersión de la luz, agregación de moléculas, cambios del medio, etc (Amin et al., 2015).

1.4.2.3 Cromatográficos

1.4.2.3.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/MS por sus siglas en inglés)

La unión de las técnicas, CG (“Cromatografía de gases”) acoplada a una espectrometría de masas permite la separación e identificación de mezclas complejas. Estas mezclas complejas están constituidas de moléculas con temperaturas de ebullición, pesos moleculares o polaridades bajas o medianas, que se adaptan al modo de trabajo de la cromatografía de gases como la espectrometría de masas ya que trabajan en fase gaseosa. La mezcla de compuestos que se inyecta en el cromatógrafo de gases se separa en la columna obteniéndose una elución de los componentes individuales aislados los cuales pasan a través del espectro de masas (Mamani & Gemio, 2016).

Existen dos estrategias fundamentales en CG-EM para la identificación respectiva de tales compuestos: (1) Uso de sustancias-estándar o patrones certificados, (2) La combinación de aproximaciones a través de (a) índices de retención (RI) en conjunto con (b) espectros de masas experimentales y (c) comparación con las bases de datos de índices de retención y espectros de masas estándar (Mamani & Gemio, 2016).

1.4.2.3.2 Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de masas (LC/MS – LG-MS/MS)

La cromatografía líquida (HPLC-MS) se utiliza para la identificación y análisis de compuestos no volátiles o térmicamente lábiles que no pueden analizarse mediante cromatografía de gases y “combina el poder de separación de los materiales de gran peso molecular de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con su capacidad de detección selectiva y confirmación de la identidad molecular del espectrómetro de masas” (Vargas & Kouznetsov, 2019).

En la cromatografía líquida, la fase móvil es, como su nombre indica, un líquido; la fase estacionaria es un polvo fino, este puede ser alúmina o sílice cubierta con octadecilsilano (ODS). Las columnas de fase normal son polares y tienen una fase móvil no polar, retienen los compuestos polares por más tiempo que los compuestos no polares. Las columnas de fase inversa son no polares y tienen una fase móvil polar, generalmente hecha de agua y solventes solubles en agua como metanol y acetonitrilo (Vila, 2021).

1.4.2.3.3 Cromatografía de capa fina (CCF)

El propósito principal de la cromatografía de capa fina es separar componentes de mezclas. Las separaciones químicas por CCF resultan de la interacción de las moléculas con las fases estacionaria y móvil. La fase móvil representa el medio de transporte para que los componentes de las muestras se separen a medida que migran a través de la fase estacionaria por fuerzas capilares. A medida que el sistema solvente se mueve hacia arriba a través de la placa, los componentes se ven afectados por dos fuerzas opuestas, la fuerza impulsora de la fase móvil y la acción resistiva o retardadora del adsorbente. Estos adsorbentes, generalmente, interactúan con las sustancias mediante la interacción dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno (Vallejo, Barrios & Anaya, 2021).

La migración de los componentes en un cromatograma puede ser caracterizado por un parámetro básico llamado valor R_f o factor de retención que es calculada como la relación entre la distancia recorrida por el soluto (componente) y la distancia recorrida por el frente de la fase móvil (Silver, 2020).

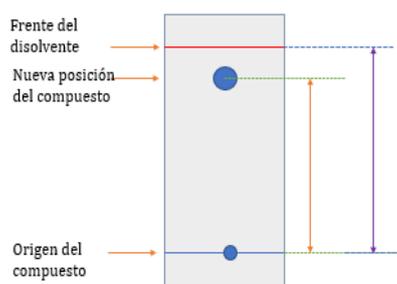


Figura 1-3: Principio de uso de la cromatografía de capa fina

1.4.3 Especies de plantas medicinales del estudio

1.4.3.1 *Origanum vulgare*

La planta medicinal, orégano, *Origanum vulgare* es una importante hierba mediterránea rica en polifenoles, timol y carvacrol con actividades antioxidantes y antimicrobianas contra microorganismos patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, entre otros. Estas propiedades son muy relevantes para la industria alimenticia porque favorecen la inocuidad y estabilidad de los alimentos (Pujada, Vega, Velásquez & Palacios et al., 2019).



Figura 1-4: Aspecto fisiológico de *Origanum vulgare* [Kamran et al., 2019]

1.4.3.2 *Ocimum basilicum* L

La albahaca (*Ocimum basilicum* L.) es una planta originaria de Asia Meridional, que pertenece a la familia de las Lamiaceae, tiene amplios y variados usos debido a sus propiedades digestivas, carminativas, espasmolíticas, antisépticas (contra bacterias y parásitos), insecticidas y sedantes. Posee un alto contenido de aceites esenciales, en especial de eugenol de amplio uso en perfumería y en formulación de atrayentes de insectos y absorbentes de radiación UV, analgésicos y biocidas.

También se emplean para la fabricación de estabilizantes y antioxidantes para plásticos y hules (Daza, Ladino & Urrutia., 2018).



Figura 1-5: Aspecto fisiológico de *Ocimum basilicum* L [Akah et al., 2018]

1.4.3.3 *Thymus Vulgaris* L

El tomillo (*Thymus Vulgaris* L), es una especie perteneciente a la familia *Lamiaceae*, empleada como condimento y planta medicinal. Al ser de este grupo, posee un olor muy característico, con tallos leñosos, hojas pequeñas y lanceoladas. Uno de los componentes principales es el timol (Sartoratto et al., 2004), responsable de la actividad antimicrobiana que actúa contra ciertos microorganismos de interés como la *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, entre otros. Además, contiene un alto grado de aceite esencial el cual se encuentra, en gran cantidad, en sus hojas (Rubio et al., 2020).



Figura 1-6: Aspecto fisiológico de *Thymus Vulgaris* L. [Chambi et al., 2017]

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

Se realizó el siguiente esquema para poder dar un contexto general del contenido de este capítulo mostrándose en la figura 2-1:

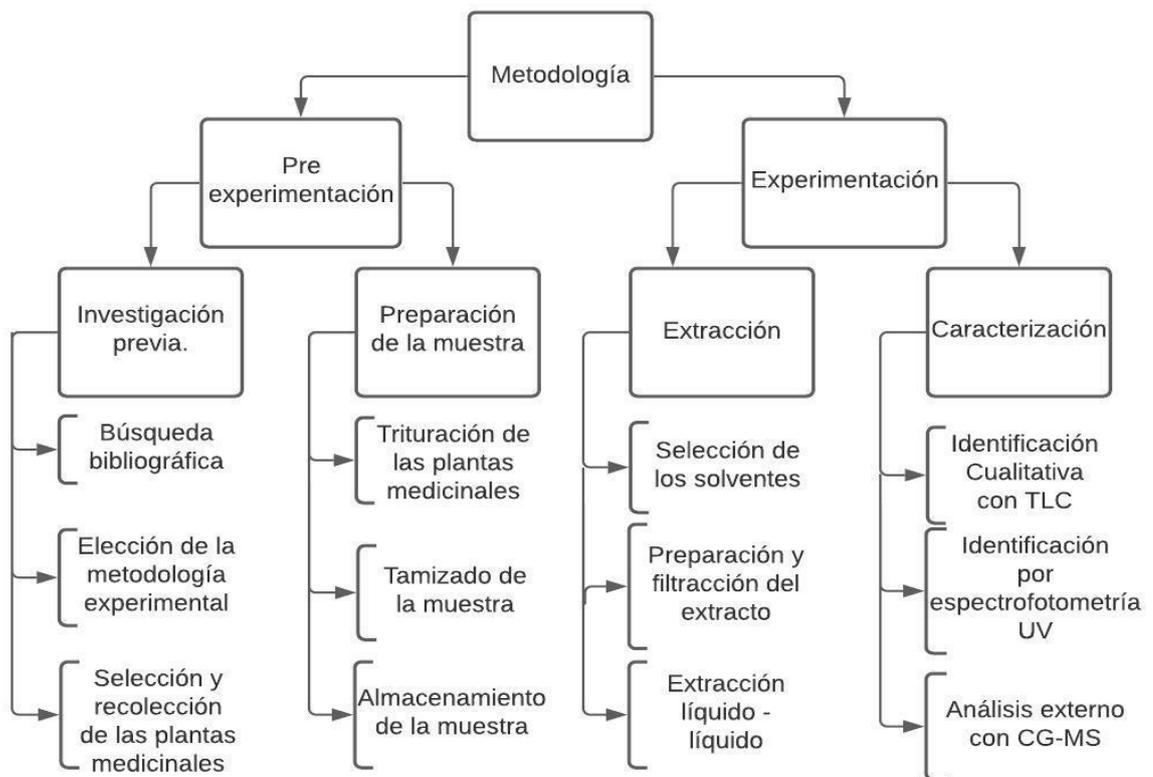


Figura 2-1: Diagrama de Etapas de la Metodología

2.1 Pre-experimentación

2.1.1 Investigación preliminar

Se realizó la búsqueda en varias fuentes bibliográficas sobre los métodos para extraer, detectar y aislar pesticidas presentes en las plantas *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum*, y *Thymus vulgaris*. Inicialmente, la revisión bibliográfica se encaminó hacia una metodología establecida comercialmente denominada QuEChERS, sin embargo, al existir la limitante en la obtención de los kits de extracción dentro del país y su precio relativamente inaccesible, se decidió por investigar una alternativa que permita el aislamiento y determinación de los pesticidas empleando

reactivos más asequibles y que, en conjunto, tengan la misma efectividad que QuEChERS posibilitando una lectura nítida y sin interferencias en el cromatógrafo de gases. Sin embargo, por efectos de restricciones de pandemia no se continuó con esta opción por lo que se decidió por desarrollar un plan donde se utiliza la cromatografía de capa fina y espectrofotometría como técnica para la caracterización de los extractos.

2.1.2 Elección de la metodología

A raíz de una investigación exhaustiva en varias fuentes bibliográficas, se seleccionó un protocolo donde se incluían tres etapas para la determinación de residuos de bifentrina como la preparación de la muestra, la extracción y la caracterización del pesticida (Samsidar, Siddiquee, & Shaarani et al., 2018). Cabe recalcar que se utilizó una metodología generalizada para una matriz sólida aplicable a las matrices de este estudio. Esta metodología se eligió una alternativa al QuEChERS para poder aislar diferentes pesticidas, adicionalmente, se realizó una extracción líquida – líquido por duplicado o también denominada réplica biológica para obtener una identificación cualitativa con los extractos a través de la cromatografía de capa fina.

2.1.3 Selección y recolección de las plantas medicinales

La elección de las plantas fue dada por la tutora del proyecto considerando las estructuras presentes y que en la literatura reportan actividad antimicrobiana contra los patógenos de cultivos de importancia económica para el Ecuador. Entre las que se puede mencionar: *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum*, *Thymus vulgaris*. Para la obtención de las plantas se priorizó aquellas cultivadas in situ en la Costa y la Sierra. *Origanum vulgare* y *Ocimum basilicum* se recolectaron en el cantón Patate de la provincia del Tungurahua. En cambio, *Thymus vulgaris*, se recolectó en la parroquia Pasa del cantón Ambato.

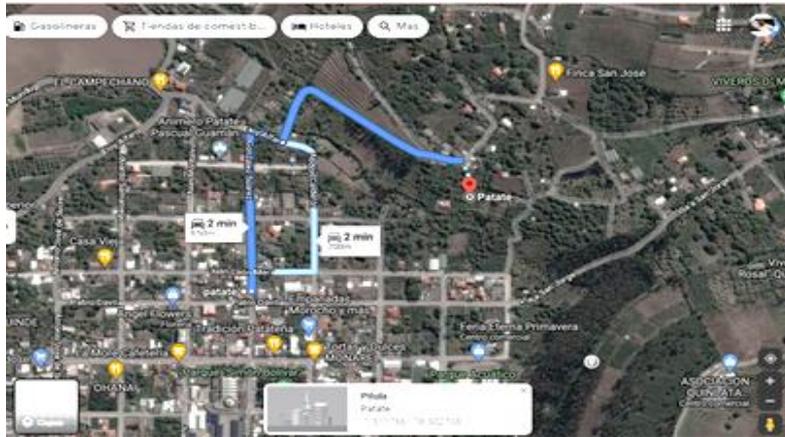


Figura 2-2: Ubicación de las especies *Origanum vulgare* y *Ocimum basilicum*

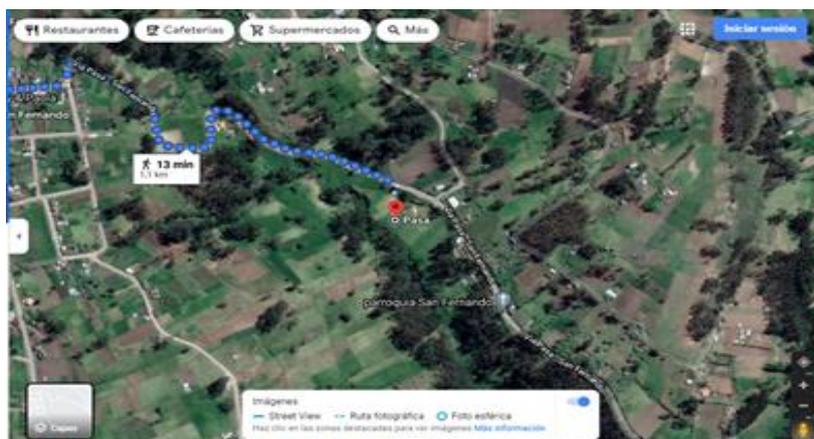


Figura 2-3: Ubicación de la especie *Thymus vulgaris*

2.1.4 Preparación de la muestra

2.1.4.1 Secado

El objetivo de esta etapa es la eliminación de agua contenida en las plantas medicinales quedando la muestra apta para ser molida y licuada sin rastros de humedad. Para ello, se colocaron las plantas en un área que no reciba lluvia ni sol para evitar su rápida degradación sobre papel periódico durante un período de tiempo de 2 semanas a temperatura ambiente.

A través del procedimiento indicado por Teles et al., 2021 existía la opción de utilizar un secador de bandejas tipo horno a 37°C para el secado de las plantas en estudio durante 48 horas, sin embargo, al existir la limitante de equipos de secado en

el laboratorio, se optó por la opción más sencilla, la de secado natural bajo las condiciones mencionadas con el respectivo seguimiento para que las plantas no se vean afectadas o degradadas por las condiciones ambientales de la ciudad de Guayaquil.

2.1.4.2 Trituración de la muestra

Se procedió a desprender las hojas de las plantas medicinales *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum* y *Thymus vulgaris* para luego ser trituradas con equipos mecánicos y almacenadas en fundas zipped evitando su deterioro. Finalmente se utilizó un tamiz con el fin de reducir el tamaño de las partículas hasta 0.5 milímetros.

2.2 Experimentación

2.2.1 Extracción

2.2.1.1 Selección de Solventes

La fase de extracción precisó del uso de solventes como el cloruro de metileno y acetona en el tratamiento preliminar de las muestras y la formación de la interfase para obtener del extracto. La acetona al ser miscible y polar con el agua formó una sola fase en la preparación de la muestra. Mientras que el cloruro de metileno al ser no polar generó la separación de fases, donde la fase orgánica contenía el extracto de interés (Abdallah & Malhat et al., 2019).

2.2.1.2 Preparación preliminar del extracto

Antes de proceder con la extracción, se realizó una limpieza de 5 g de la muestra con 35 mL de acetona, homogeneización durante una hora en un agitador mecánico (Llvisaca et al., 2018), filtración por gravedad y lavado con el mismo solvente (Guzmán-Maldonado et al., 2020). Este procedimiento fue realizado por duplicado en cada una de las especies con los diferentes pesos indicados en la Tabla 2-1:

Tabla 2-1: Cantidad de muestra empleados en la extracción

	Albahaca <i>Ocimum basilicum</i>	Tomillo <i>Thymus vulgaris</i>	Orégano <i>Origanum vulgare</i>
Muestra 1	5.0007 g	5.0010 g	5.0079 g
Muestra 2	5.0010 g	5.0011 g	5.0028 g

2.2.1.3 Extracción líquido – líquido

En la etapa de extracción líquido - líquido se emplearon las muestras del paso anterior que fueron almacenadas en un embudo de decantación añadiendo una solución al 4% p/v de sulfato de sodio en 45 mL de agua para evitar emulsiones. Se realizó la extracción de la fase orgánica con 15 mL de cloruro de metileno, donde el extracto se recolectó por decantación y luego se filtró con 3 g de sulfato de sodio para retener restos de agua que hayan quedado en la solución. Se repitió el procedimiento con 10 mL de cloruro de metileno para poder aprovechar la mayor cantidad de fase orgánica presente. Cabe recalcar que la densidad del cloruro de metileno es 1.33 g/mL, por lo que la fase de interés se encontró en la parte inferior de la interfase (Shiroma, et al., 2019). En la Tabla 2-2 se adjuntan los volúmenes de muestra de cada planta medicinal y los de solventes utilizados para la formación de la fase orgánica en la extracción Líquido – Líquido.

Tabla 2-2: Cantidades en mililitros de los diferentes reactivos para la extracción L-L

Muestras		Volumen de muestra (mL)	Volumen de Na ₂ SO ₄ (mL)	Volumen de CH ₂ Cl ₂ (mL)
Albahaca <i>Ocimum basilicum</i>	Réplica 1	10	30	25
	Réplica 2	20	35	35
Tomillo <i>Thymus vulgaris</i>	Réplica 1	10	30	25
	Réplica 2	15	35	30
Orégano <i>Origanum vulgare</i>	Réplica 1	15	35	30
	Réplica 2	20	35	35

2.2.2 Caracterización

2.2.2.1 Identificación cualitativa con cromatografía de capa fina

Luego de la preparación de los extractos, se realizó la identificación cualitativa del pesticida a través de cromatografía de capa fina (Sherma & Rabel, 2018). Los reactivos que se utilizaron fueron:

- 250 mL de solución de Nitrato de Plata al 1% p/v.

- Placa de Alúmina revestida con un espesor de 200 μm y dimensiones de 8 x 9 cm.
- Eluyente: Acetato de Etilo

Para el pretratamiento de las placas de alúmina, se roció una solución de AgNO_3 al 1% p/v. Tal solución fue preparada a partir de 2.5 g de AgNO_3 sólido en 250 mL de agua. Las placas se secaron al ambiente y finalmente se almacenaron para su uso. A partir de los criterios de la polaridad, bajo punto de ebullición, baja viscosidad para un mejor desplazamiento sobre la superficie de alúmina, se seleccionó el acetato de etilo como solvente (Liu et al., 2017).

Se vertió una cierta cantidad del eluyente en un vaso de precipitación. Después, se colocó 30 μL de cada extracto a 1 cm del fondo de la placa con una distancia entre puntos de 1 cm alineándose en fila. Se introdujo la placa en el vaso con el eluyente tal como se refleja en la figura 2-4. Una vez que el eluyente haya recorrido una distancia mayor a las tres cuartas partes de la placa, se procedió a marcar el frente del eluyente permitiendo visualizar con mayor claridad el recorrido que tuvo cada extracto a lo largo de la placa y comparar este recorrido con el estándar.

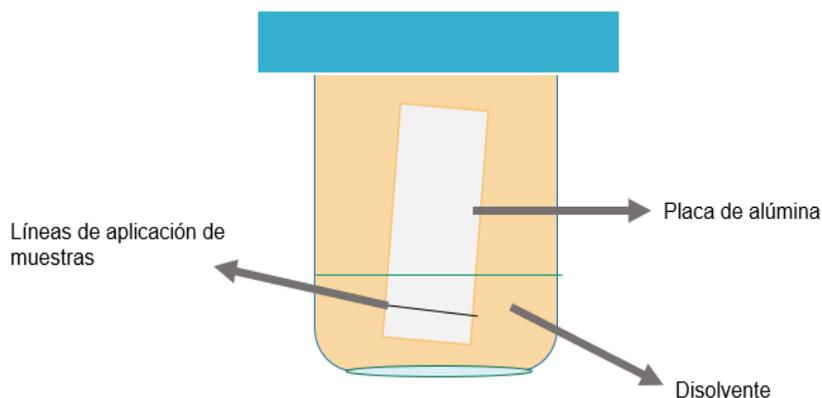


Figura 2-4: Sistema de Cromatografía de capa fina.

Finalmente se retiró la placa del vaso de precipitación, se dejó secar al aire y se ubicó la misma en una lámpara con radiación UV para visualizar las manchas de la muestra. Las placas que contenían manchas de color negro denotaron la presencia cualitativa de un pesticida sintético piretroide.

2.2.2.2 Identificación por espectrofotometría UV

La caracterización espectrofotométrica se realizó con los extractos de las especies *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum* y *Thymus vulgaris*. Se utilizó el espectrofotómetro *Spectronic Genesys 5* tomando en cuenta una configuración de lectura entre nivel de absorbancia y la longitud de onda de 200 a 700 nm. El procedimiento empleó etanol como muestra blanco donde no se efectuaron diluciones con los extractos ya que se optó por realizar un barrido para la identificación cualitativa del pesticida y comparar estos resultados con los de la metodología de cromatografía de capa fina. Luego de la calibración del equipo, se ubicó en el espectrofotómetro la muestra blanco y posteriormente cada extracto para la lectura respectiva.

2.2.2.3 Análisis externo con CG-MS

Con el fin de tener un análisis confirmatorio en la detección de pesticida en las plantas de estudio, se decidió contratar los servicios de un laboratorio externo, AGQ Labs debido a la inaccesibilidad de infraestructura y equipos del laboratorio CIBE a raíz de las restricciones de la pandemia. Este laboratorio externo empleó la metodología de extracción en fase sólida dispersiva o QuEChERS para el aislamiento del pesticida bifentrina y la técnica de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas tándem (GC-MS/MS) para su caracterización. Los resultados de concentración en mg/kg de bifentrina en las tres plantas medicinales: *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum* y *Thymus vulgaris* permitió una comparación y confirmación de resultados con los métodos de detección cualitativos, es decir, la cromatografía de capa fina y espectrofotometría. Los resultados tardaron en ser entregados, 10 días hábiles

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Los resultados obtenidos de los análisis cualitativos realizados a los extractos de las diferentes especies evaluadas se detallan a continuación.

3.1 Análisis en la etapa preliminar

De acuerdo con la Tabla 2-2. donde se especifica la cantidad de muestra y solventes utilizados previo a la extracción, se observó una variación de volúmenes de Na_2SO_4 en solución y el CH_2Cl_2 en la Réplica 2 a diferencia de la Réplica 1 donde se observó una rápida volatilización de la acetona. Esta diferencia de volúmenes ocasionó que en la Réplica 2 de orégano, albahaca y tomillo se requiera de un volumen adicional de Na_2SO_4 en solución y CH_2Cl_2 para su homogenización. Por tanto, esto implicó un mayor tiempo necesario para la formación de la interfase luego de la homogenización, de 10 a 20 minutos.

Adicional a ello, la presencia de emulsiones se redujo mediante la agitación de la solución previo a la adición del solvente de extracción.

3.2 Resultados de la caracterización

La cromatopla de los extractos selectivos realizados en cada una de las muestras y su correspondiente estándar se puede observar en la figura 3-1, la cual fue comparada con un espectro del estándar realizado por espectrofotometría de 200 a 700 nm.

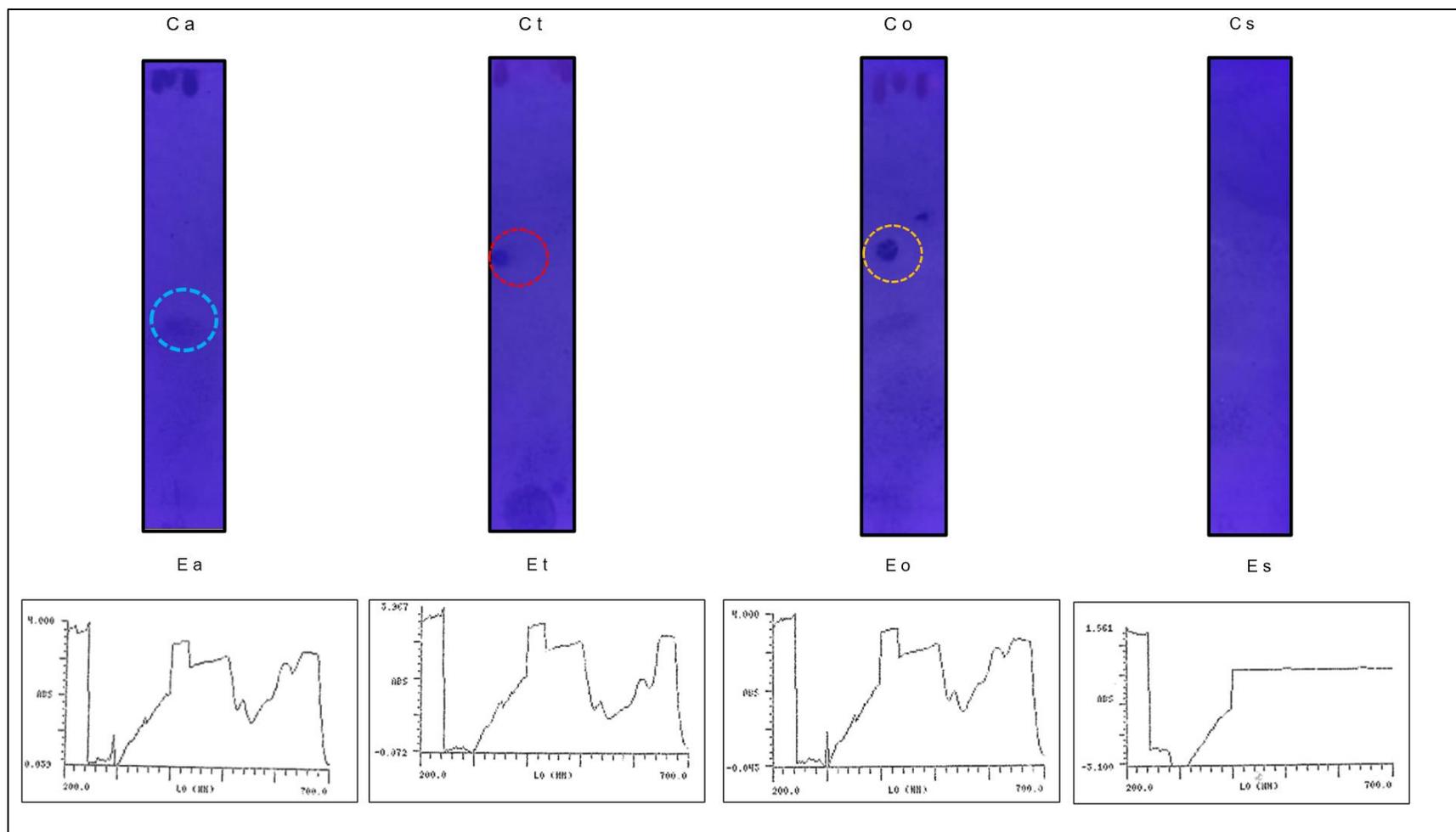


Figura 3-1: Cromatoplaqa y Espectrograma UV-Vis: Albahaca, Tomillo, Orégano y el estándar de bifentrina

Ca: Cromatoplaqa de Albahaca; Ct: Cromatoplaqa de Tomillo; Co: Cromatoplaqa de Orégano Cs: Cromatoplaqa del Estándar
 Ea: Espectrograma de Albahaca; Et: Espectrograma del Tomillo; Eo: Espectrograma del Orégano; Es: Espectrograma del Estándar

3.2.1 Análisis de resultados de la identificación de la bifentrina mediante Cromatografía de Capa Fina

De acuerdo con la figura 3-1 y los códigos Ca, Ct y Co se pudo observar a través de la luz UV, manchas negras en las cromatoplasmas de las muestras de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*; mientras que en *Ocimum basilicum* se pudo observar una ligera mancha grisácea. Según la literatura, compuestos que contienen cloro (que forman parte de algunos de los pesticidas sintéticos piretroides) se detectan cualitativamente a través de manchas de color negro como las encontradas en las cromatoplasmas del tomillo y orégano (Hassan et al., 2020).

Este mismo autor refiere en su artículo que el grupo de halogenuro de alquilo es uno de los sustituyentes encontrados en la estructura química de varios sintéticos piretroides que se adsorben en la alúmina, la cual tiene la capacidad de retener con gran fuerza estos compuestos en sus centros activos polares por lo que, a raíz de estas interacciones, se forman las manchas observadas en las cromatoplasmas.

Cabe señalar que los compuestos halogenados se pueden visualizar en luz ultravioleta debido a la formación de haluros de plata, un ejemplo de lo mencionado son los compuestos sintéticos piretroides como la permetrina que contiene átomos de cloro y la deltametrina átomos de bromuro. Cuando estos se irradian en luz UV en compuestos formados como el cloruro de plata y el bromuro de plata se oscurecen y finalmente se vuelven negros, esto concuerda con las manchas negras detectadas en las cromatoplasmas de tomillo y orégano las cuales son un indicador de presencia de un pesticida sintético piretroide. Sin embargo, en el caso de la formación del fluoruro de plata, las manchas se oscurecen y permanecen de color amarillo parduzco que concuerda con la leve mancha observada en la cromatoplasma de la albahaca la cual es un indicador de presencia de Bifentrina la cual contiene átomos de Flúor y Cloro como sustituyentes de haluros de alquilo (Sciutto et al., 2017).

En el estándar de la bifentrina no se observó mancha alguna, esto pudo deberse a que la solución del estándar estaba muy diluida y como regla general según estudios previos aproximadamente 10 mg de un compuesto en 1 ml de solvente permite una mejor visualización en cuanto a tamaño y coloración de la mancha (Sciutto et al., 2017).

3.2.2 Análisis de resultados de identificación de la bifentrina mediante Espectrofotometría UV-Vis

Se profundizó este análisis para confirmar la presencia del pesticida mediante los espectrogramas de la figura 3-1 que fueron obtenidos a partir del estudio: “Elaboración de bioproductos de aplicación en la agricultura, salud, alimentos e industria” desarrollado en paralelo en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). En el espectrograma de la albahaca se pudo observar un pico (nivel de absorbancia) que recayó en una longitud de onda cercana al de bifentrina, 254 nm. Sin embargo, se puede observar también la presencia de otros picos adyacentes al del característico de la bifentrina lo que evidencia interferencias en el extracto que abarcan un amplio espectro de aceites esenciales, flavonoides, fenoles, lípidos, pigmentos naturales y azúcares (Rutkowska et al., 2018). Este comportamiento se replicó en los espectros de tomillo y orégano, con leves picos en el rango UV de 200 – 300 nm en el barrido de longitud de onda hasta los 700 nm y que no son representativos de bifentrina.

En relación con el recorrido de la muestra del tomillo, el nivel de absorbancia en su espectrograma UV no confirmó la presencia del pesticida en su longitud de onda característico. Por otra parte, en la muestra del orégano, su espectrograma mostró un nivel de absorbancia mayor que las otras dos muestras, sin embargo, este tampoco fue representativo para confirmar cualitativamente la presencia de bifentrina (Kumar Jayaraj et al., 2016).

En tal caso, esto implica la necesidad de un análisis con mayor sensibilidad que únicamente lo puede proveer una cromatografía de gases acoplado a la espectrometría de masas tándem (GC-MS/MS).

Cuanto más individuales sean las piezas de información de la sustancia de interés, es decir, grupos sustituyentes específicos, usando un sistema de solventes apropiados más se indica su presencia. Sin embargo, toda esta evidencia no es una confirmación de identidad. Esto significa que, a diferencia de un método espectrométrico, el método de detección de cromatografía no puede emplearse para una identificación inequívoca

de compuestos, solo pueden proporcionar indicaciones más o menos definidas para la caracterización de las sustancias por separado.

3.2.3 Análisis resultados de identificación de bifentrina mediante GC - MS/MS desarrollados en el laboratorio externo

En los resultados del laboratorio externo para la identificación de la bifentrina en las matrices de plantas medicinales por la metodología GC-MS/MS se detectó la presencia leve de bifentrina en la albahaca en una concentración de 0.02 mg/kg, superior al límite de cuantificación establecido por la AS Accreditation Criteria for Testing Laboratories y la norma ISO/IEC 17025:2017, sin embargo, se encuentra por debajo del límite máximo residual permitido por las entidades de control. En cambio, las muestras de tomillo y orégano denotaron la ausencia del pesticida con una concentración menor al 0.01 mg/kg. La técnica empleada por el laboratorio para la identificación fue la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa tándem donde se obtuvo una confirmación de la presencia del pesticida.

A raíz de esta caracterización, se realizó una comparación entre las 3 estrategias de detección empleadas y que se muestran en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1: Cuadro comparativo entre las 3 metodologías de identificación de bifentrina

	Cromatografía TLC	Espectrofotometría	Análisis externo
<i>Ocimum basilicum</i>	Ausencia	Ausencia	Presencia: 0,020 mg/kg
<i>Thymus Vulgaris</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia: <0,010 mg/kg
<i>Origanum vulgare</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia: <0,010 mg/kg

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Al término de este proyecto se estableció un protocolo experimental de extracción para la identificación cualitativa de bifentrina empleando técnicas referidas para pesticidas organoclorados con las especies *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum* y *Thymus vulgaris*
- Se observaron manchas negras características de presencia de sintéticos piretroides en las cromatoplasmas (TLC) de orégano, tomillo y albahaca en diferentes recorridos.
- La presencia de las manchas corresponderían a otros compuestos que contienen grupos de haluros alquilo y reaccionan con el nitrato de plata y luz ultravioleta formando haluros de plata dando el color característico.
- Las técnicas empleadas en equipos de espectrofotometría y GC-MS/MS a las muestras en estudio, determinaron la presencia de bifentrina en albahaca en límites inferiores a lo permitido por los entes regulatorios, y ausencia en el orégano y tomillo.
- Las muestras del tomillo y orégano cumplen con el rango establecido por la Accreditation Criteria for Testing Laboratories e ISO/IEC Standard 17025:2017 para la bifentrina (0.010 mg/kg).
- Las muestras están aptas para ser empleadas como materia prima para el desarrollo de bioproductos en distintas aplicaciones como el control de patógenos en campo.

- Por lo antes expuesto, la técnica cromatográfica TLC se podría establecer como un método rápido de detección en comparación con la técnica de GC-MS/MS.

4.2 Recomendaciones

Se sugiere continuar con el procedimiento de extracción sólido – líquido para eliminar las interferencias procedentes de la extracción líquido líquido.

Se recomienda rotoevaporar como procedimiento posterior a la extracción líquido – líquido para eliminar el exceso de solvente que pudiese interferir en la caracterización de los pesticidas.

Se sugiere que la placa cromatográfica se seque por completo luego de la adición de la solución de Nitrato de plata para evitar inconvenientes por interferencias en el recorrido de los extractos con el eluyente.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah, O. I., & Malhat, F. M. (2019). *Thiacloprid Residues in Green Onion (Allium cepa) Using Micro Liquid–Liquid Extraction and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Agricultural Research*. doi:10.1007/s40003-019-00440-8
- Akah, N. P., Eze, K., & Omah, E. C. (2018). Proximate composition, total phenol content and sensory properties of sweet basil (*Ocimum basilicum L.*) leaves dried using different methods, *16*(3), 23. <https://doi.org/10.4314/AS.V16I3.4>
- Asela, D., del Puerto Rodríguez, M., Susana, D., Tamayo, S., Daniel, L., & Palacio Estrada, E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, *52*(3), 372–387. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032014000300010&lng=es&nrm=iso&tIng=es
- Badii, M., & Landeros, J. (2021). Plaguicidas que afectan a la salud humana y la sustentabilidad. *Cultura Científica Y Tecnológica*, (19). Obtenido de: <https://erevistas.uacj.mx/ojs/index.php/culcyt/article/view/454>
- Beneta, A., Mutavdžić Pavlović, D., Periša, I., & Petrović, M. (2018). Multiresidue GC-MS/MS pesticide analysis for evaluation of tea and herbal infusion safety, *98*(11), 987–1004. <https://doi.org/10.1080/03067319.2018.1518439>
- Betancourt-Arango, J., Ossa-Jaramillo, C., & Taborda-Ocampo, G. (2021). Extracción de plaguicidas en el aguacate Hass mediante el uso de C18 y arcillas funcionales como fase adsorbente en la metodología QuEChERS. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. doi: 10.18257/raccefyn.1235
- Campoverde Rivera, C., & Iturralde Guanochoango, K. (2020). Método de extracción en Fase Sólida con el uso de Ceniza de Cáscara de Arroz para la Biosorción de Carboplatino. *Universidad Estatal Amazónica*. Obtenido de: <https://repositorio.uea.edu.ec/handle/123456789/860>

- Chandra, R., Sharpanabharathi, N., Prusty, B. A. K., Azeez, P. A., & Kurakalva, R. M. (2021). Organochlorine pesticide residues in plants and their possible ecotoxicological and agri food impacts. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97286-4>
- Chambi Contreras, L., & Quiroz Tito, K. (2017). Extracción de aceite esencial de tomillo (*Thymus Vulgaris* L.) y su evaluación aplicada a la conservación de embutidos tipo chorizo. Universidad Nacional De San Agustín De Arequipa. Retrieved from <http://190.119.145.154/handle/UNSA/2542>
- Chen, Y., Zhu, S., Zhen, X., Shi, M., Yu, Y., Cao, J., Zheng, H. and Ye, L (2021). Miniaturized solid phase extraction of multi-pesticide residues in food supplement using plant sorbent by microwave-induced activated carbons. *Microchemical Journal*, 171, 106814. doi:10.1016/j.microc.2021.106814
- Chóez, I., Ruales, J., Ruíz, O., & Manzano, P. (2020). Antioxidant activity optimization and GC-MS profile of aqueous extracts of *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. leaves. *Natural Product Research*, 2505-2509.
- Chourasiya, S., Khillare, P. S., & Jyethi, D. S. (2014). Health risk assessment of organochlorine pesticide exposure through dietary intake of vegetables grown in the periurban sites of Delhi, India. *Environmental Science and Pollution Research* 2014 22:8, 22(8), 5793–5806. <https://doi.org/10.1007/S11356-014-3791-X>
- Coyago Montaluisa, L. & Lozano C. (2020). Determinación de organoclorados por bioacumulación en dos especies vegetales (*Lactuca sativa* L) y (medicago sativa) en procesos de fitorremediación en suelos agrícolas en la parroquia de Perucho del D.M.Q. en el periodo de marzo 2019 – febrero 2020. Ecuador: Latacunga: Universidad Técnica De Cotopaxi (UTC). Obtenido de: <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/6779>
- Damalas, C. A., & Koutroubas, S. D. (2017). Farmers' Training on Pesticide Use Is Associated with Elevated Safety Behavior. *Toxics*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/TOXICS5030019>

Daza, M., Ladino, G., & Urrutia, N. (2018). Beneficios agronómicos y ambientales de fuentes de fertilizantes nitrogenados en *Ocimum basilicum* L. *DYNA*, 85(206), 294-303. doi: 10.15446/dyna.v85n206.69103

FAO/ OMS (2016). Pesticide residues in food. Maximum residue limits. Secretariat of the Codex Alimentarius Commission. Roma, Italia. https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codextexts/dbs/pestres/pesticide-detail/es/?p_id=178

Farajzadeh, M., Khoshmaram, L., & Nabil, A. (2014). Determination of pyrethroid pesticides residues in vegetable oils using liquid–liquid extraction and dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–flame ionization detection. *Journal Of Food Composition And Analysis*, 34(2), 128-135. doi: 10.1016/j.jfca.2014.03.004

García, W., Pabón, L., & Rodríguez, P. (2019). Plantas medicinales: aspectos básicos de una alternativa terapéutica emergente para el control de las infecciones oculares bacterianas. *Ciencia y Tecnología Para La Salud Visual Y Ocular*, 17(1), 7. Obtenido de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7339495>

Gastaldi, B., Assef, Y., van Baren, C., Di, P., Lira, L., Retta, D., Arnaldo, I., Bandoni, L., Silvia, I., & González, B. (2016). Actividad antioxidante en infusiones, tinturas y aceites esenciales de especies nativas de la Patagonia Argentina. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(1), 51–62. Obtenido de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962016000100006&lng=es&nrm=iso&tlng=en

Hassaan, M., & El Nemr, A. (2020). Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. *The Egyptian Journal Of Aquatic Research*, 46(3), 207-220. doi: 10.1016/j.ejar.2020.08.007

Heshmati, A., Mehri, F., & Mousavi Khaneghah, A. (2021). Simultaneous multi-determination of pesticide residues in black tea leaves and infusion: a risk assessment study. *Environmental Science and Pollution Research International*, 28(11), 13725–13735. <https://doi.org/10.1007/S11356-020-11658-3>

- Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A., & Armand, R. (2015). The Application of Medicinal Plants in Traditional and Modern Medicine: A Review of *Thymus vulgaris*. *International Journal Of Clinical Medicine*, 06(09), 635-642. doi: 10.4236/ijcm.2015.69084
- Huanca, A., & Mamani, E. (2020). Influencia de la calidad en la competitividad de las plantas medicinales en los mercados de la provincia de Tacna. *Avances*, 22(4), 563-575. Obtenido de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7925395>
- Huérffano Barco, I., & Guerrero Dallos, J. (2018). Método cualitativo rápido (screening) para la detección de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas. *Revista Colombiana De Química*, 47(1), 16-26. doi: 10.15446/rev.colomb.quim.v47n1.62240
- Jaramillo, B., Palacio, F. & Pérez, I. (2016) Residuos de pesticidas organofosforados en frutas obtenidas de plazas de mercado y supermercados en Cartagena, Colombia. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 25, 4 39-46.
- Kamran, L., Naquvi, J., Ahamad, J., Salma, A., Ansari, S. H., & Najmi, A. K. (2019). A critical review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological uses of *Origanum Vulgare Linn.* *International Research Journal of Pharmacy*, 10(3), 7–11. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.100370>
- Liu, Y., Friesen, J., Grzelak, E., Fan, Q., Tang, T., & Durić, K. et al. (2017). Sweet spot matching: A thin-layer chromatography-based countercurrent solvent system selection strategy. *Journal Of Chromatography A*, 1504, 46-54. doi: 10.1016/j.chroma.2017.04.055
- López, A., Herrera, B., Salazar, M., Rojas, F., Gavín, V., & Escobar, J. (2017). Tomillo (*Thymus vulgaris*) como agente antimicrobiano en la producción de queso fresco. *Revista Amazónica Ciencia Y Tecnología*, 6(1), 45-54. Obtenido de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6145604>
- Loro, V. L., & Clasen, B. E. (2021). Agrochemicals: Ecotoxicology and management in aquaculture. *Aquaculture Toxicology*, 79–106. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821337-7.00010-4>

- Mamani F., & Gemio, R. (2016). Optimización en el rendimiento para la recuperación de residuos pesticidas en extracción quechers, para muestras de quinua. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Ciencias Puras y Naturales. Carrera Ciencias Químicas. Obtenido de: <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/18180/M-302.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Moreno, W., Logroño, J., & Zambrano, P. (2020). Degradación de pesticidas organoclorados mediante la aplicación de nanopartículas de TiO₂ y sus posibles aplicaciones. *Dominio De Las Ciencias*, 6(2), 803-834. Obtenido de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7425701>
- Muñiz, R., Leyva, J., Jurado, J., Sarabia, O., Hernández, J., Ceballos, S., & Bejarano, I. (2019). Determinación de plaguicidas en suelo agrícola mediante extracción en fase sólida y cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) acoplada a un detector de arreglo de diodos (DAD). *Acta Universitaria*, 29, 1-14. doi: 10.15174/au.2019.2287
- Pekel, A. G., Kurtulbaş, E., Toprakçı, İ., & Şahin, S. (2020). Menthol-based deep eutectic solvent for the separation of carbamazepine: reactive liquid-liquid extraction. *Biomass Conversion and Biorefinery*. doi:10.1007/s13399-020-00707-z
- Perestrelo, R., Silva, P., Porto, P., Pereira, J. A. M., Silva, C., Medina, S., & Câmara, J. (2019). QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. *Analytica Chimica Acta*, 1070, 1–28. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2019.02.036>
- Pérez A., Leyva, D., & Gómez, F. (2018). Desafíos y propuestas para lograr la seguridad alimentaria hacia el año 2050. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 9(1), 175-189. doi: 10.29312/remexca.v9i1.857
- Pujada H., Vega, J., Velásquez, C., & Palacios, B. (2019). Niveles de orégano (*Origanum vulgare*) en la dieta y su influencia en el rendimiento productivo del pollo de engorde. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 30(3), 1077-1082. doi: 10.15381/rivep.v30i3.16599
- Ravindran, P. Megha, P. Sreedev, (2016) Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment, *Interdiscipl. Toxicol.* 9, 90–100.

- Rivera O. (2021). Estudio toxicológico de pesticidas y otras estrategias utilizadas para el control del descortezador (*Dendroctonus* spp.) en México. Universidad Autónoma De Aguascalientes. Obtenido de: <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/handle/11317/2108>
- Ronco, N., Gagliardi, L., & Castells, C. (2020). Aqueous-Organic Biphasic Systems: Extraction of Organic Compounds. *Liquid-Phase Extraction*, 91-119. doi: 10.1016/b978-0-12-816911-7.00003-7
- Rubio, A., Travieso, M., Riverón, Y., Martínez, A., Espinosa, I., & Pino, O. et al. (2020). Efecto del aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre la permeabilidad celular de *Salmonella enterica*. *Revista De Salud Animal*, 42(3). Obtenido de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-570X2020000300006&script=sci_arttext&lng=pt
- Samsidar, A., Siddiquee, S., & Shaarani, S. M. (2018). A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 188–201. doi:10.1016/j.tifs.2017.11.011
- Sánchez, J., Pérez, J., Díaz, R., & Sánchez, I. (2019). Degradación de Plaguicidas Organofosforados por Complejos Metálicos. *Journal Of Basic Sciences*, 5(15). <https://doi.org/10.19136/jobs.a5n15.3571>
- Sandoval Gío, J., Castillo, L., Zarza, E., Hernández, J., Fernández, J., & Pineda, A. (2018). Toxicidad aguda diferencial de talstar® (bifentrina) y biothrine® (deltametrina) en la tilapia nilótica *Oreochromis niloticus*. *Revista Internacional De Contaminación Ambiental*, 34(1), 45-55. doi: 10.20937/rica.2018.34.01.04
- Sharma, A., Kumar, V., Thukral, A. K., & Bhardwaj, R. (2019). Responses of plants to pesticide toxicity: An overview. *Planta Daninha*, 37. doi: 10.1590/S0100-83582019370100065
- Shiroma, L. S., Queiroz, S. C. N., Jonsson, C. M., & Bottoli, C. B. G. (2019). Extraction Strategies for Simultaneous Determination of Florfenicol and Florfenicol Amine in

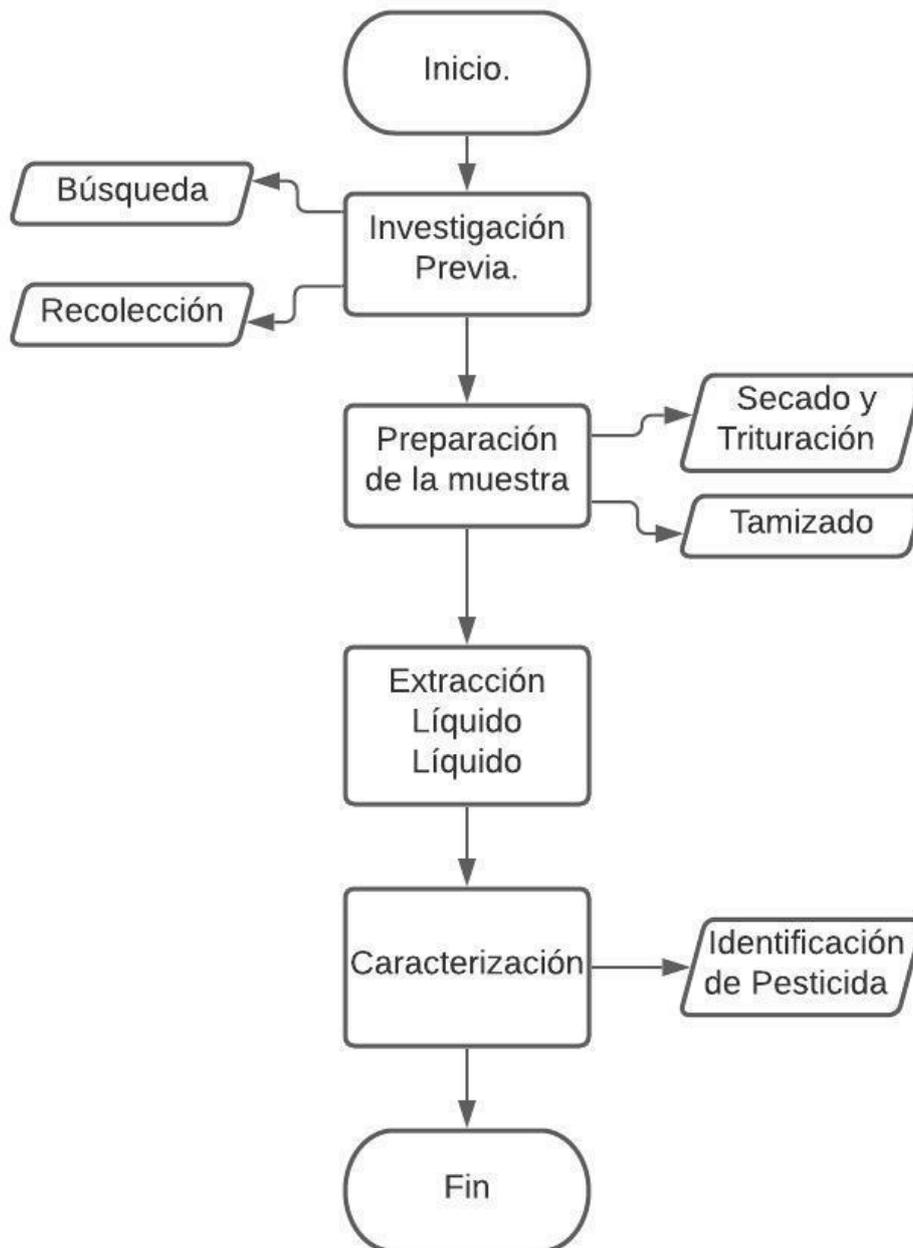
- Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Muscle: Quantification by LC-MS/MS. *Food Analytical Methods*. doi:10.1007/s12161-019-01633-1
- Silver, J. (2020). Let Us Teach Proper Thin Layer Chromatography Technique!. *Journal of Chemical Education*. doi:10.1021/acs.jchemed.0c00437
- Siraj, J., Mekonen, S., Astatkie, H., & Gure, A. (2021). Organochlorine pesticide residues in tea and their potential risks to consumers in Ethiopia. *Heliyon*, 7(7), e07667. doi: 10.1016/j.heliyon. 2021.e07667
- Stashenko, E., & René, J. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*, 29–47. <https://doi.org/10.4322/sc.2012.010>
- Tripathy, A. Saha, & J. Kumar. (2017). Detection of pesticides in popular medicinal herbs: a modified QuEChERS and gas chromatography-mass spectrometry-based approach. *Journal of Food Science and Technology*, 54(2), 458–468. <https://doi.org/10.1007/S13197-017-2487-X>
- Urban, P. L. (2015). Quantitative mass spectrometry: an overview. <https://royalsocietypublishing.org/doi/pdf/10.1098/rsta.2015.0382>
- Ulloa, E. (2016). Caracterización del sector productivo de plantas medicinales en Costa Rica. *Procomer Costa Rica Exporta*.
- Vallejo, Y., Barrios, L., & Anaya, J. (2021). La cromatografía en capa fina: una alternativa vigente en la industria farmacéutica. *Revista De Química*, 35(2), 19-25. Obtenido de: <https://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/23788>
- Vargas, L., & Kouznetsov, V. (2019). Defensa química en la naturaleza: Aspectos Químicos de las toxinas en plantas y animales terrestres. Bucaramanga: Ediciones Universidad Industrial de Santander.
- Vila-Rodríguez, Á. (2021). Determinación de plastificantes en simulantes mediante HPLC-MS. Obtenido de: <http://tauja.ujaen.es/handle/10953.1/13974>

- Wallace, K., Sargent, D., Weiner, M., Thatheyus, A. J., Deborah, A., & Selvam, G. (2013). Synthetic Pyrethroids: Toxicity and Biodegradation. *Applied Ecology and Environmental Sciences*, 1(3), 33–36. <https://doi.org/10.12691/aees-1-3-2>
- Wu, N., Zhao, L., Jiang, C., Li, P., Liu, Y., Fu, Y., & Ye, F. (2020). A naked-eye visible colorimetric and fluorescent chemosensor for rapid detection of fluoride anions: Implication for toxic fluorine-containing pesticides detection. *Journal Of Molecular Liquids*, 302, 112549. doi: 10.1016/j.molliq.2020.112549
- Zhang, Dong, Hao, Han, Song, & Yao. (2019). Evaluation of cleanup procedures in pesticide multiresidue analysis with QuEChERS in cinnamon bark. *Food Chemistry*, 276, 140–146. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.10.019>
- Zhan, H., Huang, Y., Lin, Z., Bhatt, P., & Chen, S. (2020). New insights into the microbial degradation and catalytic mechanism of synthetic pyrethroids. *Environmental Research*, 182. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2020.109138>
- Hassan Mohammed, S. A., Tripathi, R., & Sreejith, K. (2020). Plant Metabolites: Methods for Isolation, Purification, and Characterization. *Plant Metabolites: Methods, Applications and Prospects*, 23–56. https://doi.org/10.1007/978-981-15-5136-9_2
- Sciutto, G., Prati, S., Bonacini, I., Litti, L., Meneghetti, M., & Mazzeo, R. (2017). A new integrated TLC/MU-ATR/SERS advanced approach for the identification of trace amounts of dyes in mixtures. *Analytica Chimica Acta*, 991, 104–112. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2017.08.020>
- Rutkowska, E., Łozowicka, B., & Kaczyński, P. (2018). Modification of multiresidue QuEChERS protocol to minimize matrix effect and improve recoveries for determination of pesticide residues in dried herbs followed by GC-MS/MS. *Food Analytical Methods*, 11(3), 709–724. <https://doi.org/10.1007/S12161-017-1047-3/FIGURES/4>

APÉNDICES

APÉNDICE A. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA IMPLEMENTADO

APÉNDICE A



APENDICE B. FOTOS EXPERIMENTACIÓN



Figura B. 1 Secado del orégano



Figura B.2 Secado del Tomillo



Figura B.3: Secado de la Albahaca



Figura B.4: Pesado de la Albahaca



Figura B.5: Pesaje de tomillo



Figura B.6: Pesaje del orégano



Figura B.7 Inicio del proceso de Filtración de las muestras

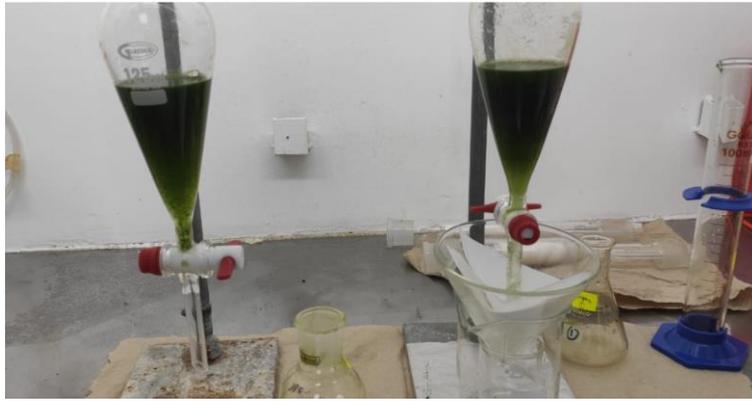


Figura B.8 Inicio del proceso de Extracción Líquido - Líquido



Figura B.9 Extracción Líquido - Líquido por agotamiento

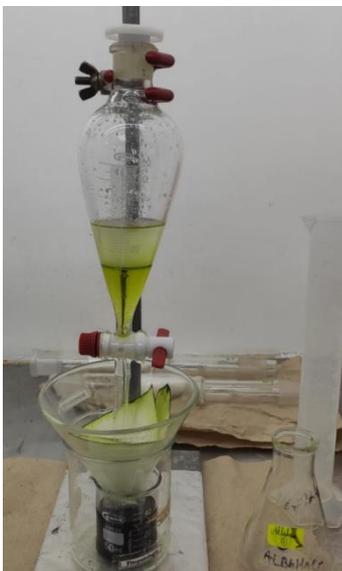


Figura B.10 Extracción Líquido - Líquido de Albahaca.



Figura B.11 Extracción Líquido - Líquido del tomillo



Figura B.12 Extracción Líquido - Líquido del orégano



Figura B.13 Solución reveladora Nitrato de Plata



Figura B.14 Solución de Acetato de etilo.



Figura B.15 Medición de las placas cromatográficas.



Figura B.16 Placa Cromatográfica con extractos y estándar.



Figura B.17 Sistema de Cromatografía de capa fina con eluyente.

APENDICE C. INFORME DE RESULTADOS DE LABORATORIO EXTERNO



INFORME DE ENSAYO




Nº de Referencia:	AL-22/009108	Registrada en:	Qualityterra	Cliente (*):	BORRERO ARIAS NOHELYA CRISTINA		
Análisis:	GC-US-0103 (Bifenthrin)	Centro Análisis:	AGQ USA	Contrato:	22172920-a		
Tipo Muestra:	ALBAHACA	Fecha Recepción:	17/01/2022	Cliente 3º(*):	----		
Fecha Inicio:	25/01/2022	Fecha Fin:	27/01/2022				
Descripción(*):	ALBAHACA						

Fecha/Hora	17/01/2022	Muestreado por:	Cliente (*)
Muestreo:			

Hemos detectado los siguientes resultados iguales o superiores al LC. Resumen de cumplimiento de LMR se obtiene por los datos suministrados por bcglobal.bryantchristie.com (Servicio suministrado B&C)

Parámetro	Resultado	Unidades	US	UE	CX	CA	CN
Bifentrina	0,020	mg/kg	0,050	0,020	N/L	0,100	0,050

LMR's en rojo: Los resultados (sin aplicar incertidumbre) superan el LMR establecido por legislación. N/L (No Legislado): LMR específico no establecido para esta materia activa. Los LMR cambian frecuentemente y por tanto la información puede estar obsoleta. Aunque esta información se actualiza periódicamente, indicamos que la información aquí contenida sólo pretende ser una referencia inicial y que no hay garantía de que la información sobre LMRs no este exenta de errores

Los Resultados emitidos en este informe, no han sido corregidos con factores de recuperación. Siguiendo el protocolo recogido en nuestro manual de calidad, AGQ guardará bajo condiciones controladas la muestra durante un periodo determinado después de la finalización del análisis. Una vez transcurrido este periodo, la muestra será eliminada. Si desea información adicional o cualquier aclaración, no dude en ponerse en contacto con nosotros.

RESULTADOS ANALITICOS

PNT: PE-674_Q_AL_CG		Técnica: Cromatog CG/MS-MS				Unidades: mg/kg		Incert: ± 40 %	
Parámetro	Resultado	LC	Parámetro	Resultado	LC	Parámetro	Resultado	LC	
Bifentrina	0,020	0,010							

Nota: LC.: Límite de Cuantificación. SP: sólo parental. Los Resultados de este informe solo afectan a la muestra tal como es recibida en el laboratorio.



INFORME DE ENSAYO




Nº de Referencia:	AL-22/009107	Registrada en:	Qualityterra	Cliente (*):	BORRERO ARIAS NOHELYA CRISTINA		
Análisis:	GC-US-0103 (Bifenthrin)	Centro Análisis:	AGQ USA	Contrato:	22172920-a		
Tipo Muestra:	TOMILLO	Fecha Recepción:	17/01/2022	Cliente 3º(*):	----		
Fecha Inicio:	25/01/2022	Fecha Fin:	27/01/2022				
Descripción(*):	TOMILLO						

Fecha/Hora	17/01/2022	Muestreado por:	Cliente (*)
Muestreo:			

No se han detectado Resultados iguales o superiores al LC en la Muestra Analizada.

RESULTADOS ANALITICOS

PNT: PE-674_Q_AL_CG		Técnica: Cromatog CG/MS-MS				Unidades: mg/kg		Incert: ± 40 %	
Parámetro	Resultado	LC	Parámetro	Resultado	LC	Parámetro	Resultado	LC	
Bifentrina	<0,010	0,010							

Nota: LC.: Límite de Cuantificación. SP: sólo parental. Los Resultados de este informe solo afectan a la muestra tal como es recibida en el laboratorio.

Nº de Referencia:	AL-22/009100	Registrada en:	Qalyterra	Cliente (*):	BORRERO ARIAS NOHELYA CRISTINA
Análisis:	GC-US-0103 (Bifenthrin)	Centro Análisis:	AGQ USA	Contrato:	22172920-a
Tipo Muestra:	OREGANO	Fecha Recepción:	17/01/2022	Cliente 3º(*):	----
Fecha Inicio:	25/01/2022	Fecha Fin:	27/01/2022		
Descripción(*):	OREGANO				

Fecha/Hora	17/01/2022	Muestreado por:	Cliente (*)
Muestreo:			

No se han detectado Resultados iguales o superiores al LC en la Muestra Analizada.

Los Resultados emitidos en este informe, no han sido corregidos con factores de recuperación. Siguiendo el protocolo recogido en nuestro manual de calidad, AGQ guardará bajo condiciones controladas la muestra durante un periodo determinado después de la finalización del análisis. Una vez transcurrido este periodo, la muestra será eliminada. Si desea información adicional o cualquier aclaración, no dude en ponerse en contacto con nosotros.

RESULTADOS ANALITICOS

PNT: PE-674_Q_AL_CG		Técnica: Cromatog CG/MS-MS		Unidades: mg/kg		Incert: ± 40 %		
Parámetro	Resultado	LC	Parámetro	Resultado	LC	Parámetro	Resultado	LC
Bifentrina	<0,010	0,010						

Nota: L.C.: Límite de Cuantificación. SP: sólo parental. Los Resultados de este informe solo afectan a la muestra tal como es recibida en el laboratorio.