

# ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS Y AMBIENTALES

PROYECTO DE GRADUACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

“MAGÍSTER EN MANEJO INTEGRAL DE LABORATORIOS DE  
DESARROLLO”

TEMA

**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES RESIDUALES DE  
PESTICIDAS ORGANOCLORADOS EN CAMARONES  
(*Litopenaeus Vannamei*) DE PRODUCCIÓN ACUÍCOLA**

AUTOR:

**SULLY CECIBEL STACIO SORROZA**

Guayaquil – Ecuador

Año

2016

## DEDICATORIA

*A mis hijos Nathalie y  
Andrés, Los cuales son mi motivación cada  
día para nunca Rendirme en cada desafío  
presentado por la vida Y así poder llegar a ser un  
ejemplo para ellos.*

*A mi esposo Ñato, por su  
Amor y Comprensión durante este largo  
Camino.*

*Sully*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A Dios por su Gracia para con mi vida.*

*A mis padres Bolívar y Rosita que con su ejemplo de vida, me enseñaron a salir adelante y alcanzar mis sueños.*

*A mis hermanas, Diana y Cecil por toda la paciencia y amor entregado a mis hijos durante este tiempo.*

*A mi tutora de tesis la PhD Olga Gonzáles, por brindarme todas facilidades para alcanzar esta meta.*

*A mi amiga y compañera de trabajo Fernanda por su apoyo prestado para culminar este proyecto.*

*A Jully mi compañera de maestría con la que inicié y termine esta aventura de tesis*

**SULLY**

## DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por los hechos y doctrinas expuestas en este tipo de Proyecto de Graduación, me corresponde exclusivamente; el patrimonio intelectual del mismo, corresponde exclusivamente a la **Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Departamento de Ciencias Químicas y Ambientales** de la Escuela Superior Politécnica del Litoral.



---

**SULLY CECIBEL STACIO SORROZA**

## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



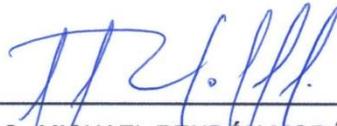
---

DAVID MATAMOROS CAMPOSANO Ph.D  
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



---

OLGA GONZÁLEZ SÁNCHEZ Ph.D  
DIRECTOR DEL PROYECTO



---

M.Sc MICHAEL RENDÓN MORÁN  
VOCAL DEL TRIBUNAL

# ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
DECLARACIÓN EXPRESA	III
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN	IV
	IV
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ABREVIATURAS	X
OBJETIVOS	XII
INTRODUCCIÓN	XIII
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>1</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	<b>1</b>
1.1 Generalidades del camarón	1
1.1.1. Identificación taxonómica del camarón	2
1.1.2 Valor nutricional del camarón	2
1.2 Acuicultura	3
1.2.1 Exportaciones de camarón	5
1.3. Pesticidas	6
1.3.1 Pesticidas Según su función	7
1.3.2. Según su estructura química	7
1.3.3 Según el modo de acción	8
1.3.4. Según su peligrosidad	9
1.4. Pesticidas organoclorados	9

1.4.1	Pesticidas considerados en la tesis	11
1.4.1.1	Beta hexaclorociclohexano ( $\beta$ -HCH)	11
1.4.2.	Aldrín y Dieldrín	11
1.4.1.3	DDT Y DDE	12
1.4.1.4	Endrín	13
1.4.1.5	Beta endosulfan	14
1.4.1.6	Heptacloro	14
1.4.1.7	Metoxicloro	15
1.5.	Disposiciones legales relacionadas con COPs.	16
1.5.1	Normativas referente a los residuos de pesticidas	16
1.6.1.	Análisis multi-residuos (MMR)	18
1.7.	Cromatografía de gases	19
	<b>CAPÍTULO II</b>	<b>23</b>
<b>2.</b>	<b>ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS</b>	<b>23</b>
2.1.	Control de función de respuesta instrumental	24
2.2.	Muestras duplicadas	24
2.3.	Uso de blancos	24
2.4.	Materiales de referencia (MRs)	25
2.5.	Pruebas interlaboratorio	25
	<b>CAPÍTULO III</b>	<b>26</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
3.1.	Reactivos	26
3.1.1	Gases	27
3.1.2	Patrones y materiales de referencia	27
3.2.	Materiales	27
3.2.1	Materiales usados para la extracción	27
3.2.2	Materiales de laboratorio /consumibles	28
3.3.	Equipos	28
3.4.	Metodología	28
3.4.2.	Extracción de pesticidas organoclorados	29
3.4.3.	Identificación y cuantificación de los analitos	30
3.4.4.	Pruebas de Control de Calidad. Diseño Experimental	31

<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>32</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>32</b>
4.1. Optimización del método de extracción	33
4.2. Condiciones Cromatográficas	34
4.3. Identificación de pesticidas de estudio	35
4.4. Pruebas de control de calidad	36
4.4.1. Curva de Calibración:	36
4.4.2. Blanco y Duplicado	38
4.4.3. Ensayos de Recuperación	39
4.4.4. Prueba Interlaboratorio	39
4.5. Cuantificación de compuestos organoclorados	41
4.6. Evaluación de los resultados obtenidos	43
4.7. Discusión	<b>43</b>
<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>45</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>47</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>51</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

## CAPITULO I

Figura 1.1 Identificación taxonómica del camarón	2
Figura 1.2 Exportaciones de Camarón del año 1996-2015	6
Figura 1.3 Estructura Química del Beta- HCH	11
Figura 1.4 Estructura Química del Aldrín-Dieldrín	12
Figura 1.5 Estructura Química del DDT Y DDE	13
Figura 1.6 Estructura Química del Endrín	14
Figura 1.7 Estructura Química del Beta-endosulfan	15
Figura 1.8 Estructura Química del Heptacloro	15
Figura 1.9 Estructura Química del Metoxicloro	16
Figura 1.10 Partes básicas del cromatografo de gases	22

## CAPITULO IV

Figura 4.1 Procedencia de muestra analizadas	32
Figura 4.2 Cromatograma a diferentes volúmenes de extracción	33
Figura 4.3 Curva de calibración del Aldrín	37
Figura 4.4 Cromatograma de análisis multiresiduos en camarón por duplicado	38
Figura 4.5 Cromatograma del material de control de calidad	39
Figura 4.6 Resultado del análisis de camarón en la prueba interlaboratorio	41

# ÍNDICE DE TABLAS

## CAPITULO I

Tabla 1. 1 Principales Nutrientes en el Camarón por 100 g de porción comestible	3
Tabla 1. 2 Clasificación de los Pesticidas según su estructura química	7
Tabla 1.3 Clasificación de los pesticidas según al grupo al que pertenecen	8
Tabla 1.4 Clasificación de los pesticidas según el modo de acción	9
Tabla 1.5 Clasificación de los pesticidas según su peligrosidad	9

## CAPITULO IV

Tabla 4.1 Condiciones cromatográficas	34
Tabla 4.2 Tiempo y orden de aparición de los pesticidas OC	36
Tabla 4.3 $R^2$ de la curva de calibración de los pesticidas de estudio	37
Tabla 4.4 Concentración de pesticidas organoclorados en la zona de Puerto Bolívar	42
Tabla 4.5 Concentración de pesticidas organoclorados en la zona de Huaquillas	43
Tabla 4.6 Resultados de pesticidas de otras investigaciones	45

## ABREVIATURAS

<b>GC</b>	Cromatografía Gaseosa
<b>HPLC:</b>	Cromatografía líquida de alta performance o eficiencia
<b>GC/MS</b>	Cromatografía de gases acoplado a masa
<b>ppb</b>	parte por billón
<b>ECD</b>	Detector con captura de electrones
<b>DDT</b>	Dicloro Difenil tricloro hexano
<b>HCH</b>	Hexacloro ciclo hexano
<b><i>Beta- HCH</i></b>	<i>Beta Hexacloro-ciclohexano</i>
<b>OC</b>	<i>Organoclorados</i>
<b>COPs</b>	<i>Compuestos organicos persistentes</i>
<b>ml</b>	<i>Mililitros</i>
<b>TR</b>	<i>Tiempo de Retención</i>
<b>SPE</b>	<i>Extraccion en fase solida</i>
<b>DSPE</b>	<i>Extracción en Fase Solida Dispersiva</i>
<b>PSA</b>	<i>Amina Primaria</i>
<b>C18</b>	<i>Carbon Activado</i>
<b>OMS</b>	<i>Organización Mundial de la salud</i>
<b>ND</b>	<i>No detectable</i>
<b>MRS</b>	<i>Metodo multiresiduo</i>
<b>INP:</b>	Instituto Nacional de Pesca
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>μl</b>	microlitro
<b>μg</b>	microgramo
<b>kg:</b>	kilogramo

<b>UE</b>	Union europea
<b>P</b>	Fosforo
<b>MRL</b>	Límite máximo de residuo
<b>V</b>	Voltios.
<b>DDE</b>	Dicloro difenil dicloro etileno
<b>DDE</b>	Dicloro difenil tricloro etano
<b>INP</b>	Instituto Nacional de Pesca
<b>LMR</b>	Límite máximo resisual

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los niveles residuales de pesticidas organoclorados que pueda estar presente en camarones (*Litopenaeus vannamei*) de producción acuícola.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Optimizar el método de extracción para la determinación de los pesticidas organoclorados de interés, por medio de fase sólida dispersiva QuECHERS.
- Establecer las condiciones de operación técnica de cromatografía de gases GC-ECD y verificar que el método de análisis desarrollado sea confiable a través de pruebas de control de calidad (pruebas de linealidad, duplicados, exactitud y pruebas interlaboratorio).
- Cuantificar la presencia de los compuestos OC de estudio en los camarones de acuicultura de zona de Puerto Bolívar y Huaquillas.
- Evaluar los resultados y comparar con las normativas nacionales e internacionales.

# INTRODUCCIÓN

La Seguridad Alimentaria se ha convertido en una de las principales preocupaciones a nivel nacional e internacional, siendo la inocuidad de los alimentos un pilar fundamental.

Según el Codex Alimentarius un alimento es considerado inocuo cuando esté presente la garantía de que no causará daño al consumidor cuando el mismo sea preparado o ingerido, de acuerdo al uso que se destine.

Los alimentos pueden contaminarse en cualquier eslabón de la cadena alimentaria que va desde la producción hasta el consumo, ya sea porque puede contener organismos o sustancias peligrosas, que formen parte del mismo o hayan sido introducidas, a estos se los denominan agentes químicos de riesgo, entre las sustancias químicas que plantean más riesgo para la salud tenemos las toxinas naturales y los contaminantes orgánicos persistentes como las dioxinas, PCBs, y los pesticidas organoclorados.

Los pesticidas organoclorados (OC) son compuestos químicos muy persistentes en el medio ambiente acumulándose en el agua y en los sedimentos, esto se debe a su estructura molecular, presentando una solubilidad baja en el agua y alta en lípidos, lo cual permite que estas moléculas atraviesen la estructura fosfolipídica de las membranas biológicas y así acumularse en los depósitos de grasa de los organismos vivos [1].

Algunos OC son considerados altamente peligrosos por su alto grado de toxicidad y su persistencia, estos pertenecen al grupo de contaminantes orgánicos persistentes (COPs) junto con los PCBs y Dioxinas [2].

El camarón de acuicultura no está excepto de esta posible contaminación, ya que este podría estar expuesto a una gran diversidad de elementos que

afectan la inocuidad y la calidad comercial del producto, entre estos se encuentran el agua y suelos (sedimentos) que podrían ser contaminados con pesticidas organoclorados, metales pesados (mercurio, cadmio, entre otros), o con patógenos derivados de descargas de zonas agrícolas, urbanas o industriales que hacen que los cultivos de camarón reproducidos en este tipo de medio sean altamente susceptibles de producir camarón con agentes peligrosos como lo organoclorados,[6] que no de controlarse, representaría una serie de amenaza a la salud de las personas que los consume en el mercado nacional e internacional debido a que estos pueden persistir en el ambiente durante muchos años después de haber sido utilizados.

El uso de pesticidas organoclorados COPs están prohibido en el Ecuador desde el año 1985 según acuerdo ministerial 242, el uso de estos pesticidas antes de su prohibición trajo como consecuencia, la contaminación de alimentos de la canasta familiar (lechuga, cebolla de rama, limón, agua potable) contaminación en leche materna, y contaminación de algunas matrices ambientales. Después de su prohibición se encontró presencia de residuos de pesticidas organoclorados COPs en cantidades poco representativas en diferentes matrices ambientales de zonas del Ecuador [3].

En el país existe pocos estudios sobre la determinación de residuos de pesticidas organoclorados en camarón (*Litopenaeus vannamei*) de acuicultura, sin embargo hay algunos estudio realizados en países como México, Colombia entre otros, donde se han determinado presencia en concentraciones bajas que no sobre pasan los límites permitidos que puedan representar un riesgo para la salud humana [15].

En Ecuador se han realizados estudios en otras matrices diferentes a la pesquera, así en el los años 80, se han realizado varios estudios de residualidad de plaguicidas clorados COPs en matrices ambientales de aguas, suelos y sedimentos, así como en leche materna y ciertos alimentos de la canasta básica (Fernández y López, 1985; Santacruz, 1985) [5]. Así también en el año 2000 a través del proyecto Taura, Fundacyt 2000, se realizó una

evaluación sobre la reducción de la concentración de varios contaminantes, entre ellos algunos plaguicidas COPs [5] [15].

La presente investigación con el propósito de evaluar los niveles residuales de pesticidas organoclorados que puedan estar presentes en el camarón de acuicultura, realiza la identificación y cuantificación de los pesticidas organoclorados, Beta-HCH, aldrín, 4,4 DDE, Dieldrín, Endrin, B-endosulfan, 4,4 DDT, Heptacloro, y Metoxicloro, en camarones de producción acuícola de las zonas de Puerto Bolívar y Huaquillas de la provincia del Oro, la misma que servirá de línea base para la investigación sobre la contaminación de residuos de pesticidas y la elaboración de un procedimiento que sirve para determinación de los mismos.

Para el análisis de residuos de pesticidas organoclorados se utilizó la metodología multiresiduo, para la cual se mostró que el método es confiable a través de la realización de pruebas de control de calidad como pruebas de linealidad de la curva, duplicados, exactitud y pruebas interlaboratorio con organismos exteriores como Fapas, lo cual garantiza la fiabilidad de los datos.

El método de extracción QuEChERS fue usado para la determinación de pesticidas, el cual consiste en una extracción basada en el reparto de los análisis entre una fase acuosa y un disolvente, seguido de un paso de purificación de la fase orgánica mediante un proceso de dispersión, utilizando como solvente orgánico acetonitrilo acidificado al 1% con ácido acético.

La identificación y cuantificación de los pesticidas fue a través de cromatografía de gases (GC) usando como detector captura de electrones (ECD).

De las muestras evaluadas el 82% fueron no detectables y el 18% se detectaron áreas pequeñas, las cuales dieron concentraciones de residuos por debajo de 10 ppb. Para las normativas nacionales e internacionales

Debido a la persistencia en el ambiente que presentan estos compuestos en la dispersión de los mismos en la atmósfera y por considerarse bioacumulables en los productos pesqueros y acuícolas, cada vez es más importante para los consumidores, productores y autoridades responsables del control de calidad de estos productos realizar el seguimiento de la presencia de residuos de pesticidas organoclorados en los diferentes ecosistemas sujetos a la influencia del hombre [1].

# **CAPÍTULO I**

## **1. MARCO TEÓRICO**

### **1.1 Generalidades del camarón**

Los camarones son animales invertebrados pertenecientes al grupo de los crustáceos, crecen por medio de mudas sucesivas a lo largo de su ciclo de vida, y presentan metamorfosis durante su primera fase de vida.

El camarón de acuicultura se crían en grandes estanques, que suelen ser de por lo menos un metro de profundidad este puede situarse sobre una laguna de inundación natural, sobre un área de cultivo de arroz en parcelas inundadas u otras tierras agrícolas apropiadas, en planicies salinas costeras o en sitios excavados luego de talar artificialmente un manglar.

Existen algunas especies de camarones marinos utilizadas para el propósito de cultivo en algunos países, entre las principales especies capturadas en Ecuador se encuentra la especie *Litopenaeus vannamei* la cual es considerada de mayor importancia comercial, debido a su adaptación en el cultivo. Presenta un tamaño medio es de 25 cm de longitud total, se distribuye desde Esmeraldas hasta Puerto Bolívar [2].

### 1.1.1. Identificación taxonómica del camarón (*Litopenaeus vannamei*)

Nombre común	Español: Camarón Patiblanco o Camarón Blanco Inglés: White Shrimp
Familia	<i>Penaeidae</i>
Clase	<i>Malacostraca</i>
Genero	<i>Litopenaeus</i>
Especie	<i>Vannamei</i>



**Figura 1.1 Camarón Blanco *Penaeus Vannamei***

Fuente: Catalogo Crustáceos de Mayor Importancia Comercial en el Ecuador. Instituto Nacional de pesca [4].

### 1.1.2 Valor nutricional del camarón

Desde el punto de vista nutricional, el camarón es un alimento alto en proteínas, bajo en grasa saturadas y calorías, es también una fuente rica de vitamina B12, selenio, ácidos grasos altamente insaturados tipo omega-2 y astaxantina que es un potente antioxidante natural [5].

A pesar de contener estos parámetros nutricionales con lo que se podría considerar al camarón como un alimento saludable para la salud existe resistencia a su consumo debido a su alto contenido de colesterol, considerándolo como un alimento que se debe evitar ingerir en caso de enfermedades cardiovasculares, olvidándose de los beneficios asociados los cuales engloban el efecto combinado de todos los nutrientes presentes, incluyendo las proteínas, minerales y carotenoides.

El valor nutricional puede variar de acuerdo a la alimentación, ubicación geográfica, especies y edad, en análisis realizados [6] para la determinación nutrientes en el músculo de camarón *Penaeus* se encontró que las tres cuartas

partes de la porción comestibles es decir el 75% está constituido por agua y el 80% de la porción restante (materia seca) es proteína, Tabla 1.1.

**Tabla 1. 1 Principales Nutrientes en el Camarón por 100 g de porción comestible.**

<i>NUTRIENTES</i>	<i>CANTIDAD</i>	<i>UNIDADES</i>
PROTEINA	19.4	Gramos
LIPIDOS	1.15	Gramos
AGUA	76.2	Gramos
ENERGIA	89.0	Kcal
COLESTEROL	172	Mg
Ac. DOCOSAHEXAENOICO(DHA)	75,5	Mg
Ac. EICOSAPENTAENOICO(EPA)	112.0	Mg
FOSFORO	202.4	Mg
POTASIO	259.6	Mg
SODIO	176.1	Mg
SELENIO	44.0	Mg

Fuente: Revista Acuicultura edición # 106. 2015 [5]

## **1.2 Acuicultura**

La acuicultura es la técnica de cultivo de organismos acuáticos los cuales incluyen las especies de peces, crustáceos (camarones), moluscos, anfibios y reptiles, invertebrados acuáticos y algas marinas y de agua dulce, se calcula que se crían más de 600 especies acuáticas en todo el mundo en diversos sistemas e instalaciones de cultivo [7].

Esta actividad se mantiene como uno de los sectores de producción de alimentos de más rápido crecimiento en las últimas tres décadas, tendiendo a nivelarse a la producción de la pesca de captura en lo que se refiere a la alimentación de la población en el mundo, siendo así que se cree que en los

próximos diez años la acuicultura junto con la pesca de captura superará a la de carne de vacuno, porcino y aves de corral [8].

La producción acuícola ha progresado con la ayuda de la innovación tecnológica para satisfacer las necesidades cambiantes de una población cada vez mayor [2] [8]. La tecnología utilizada puede variar desde la más sencilla como es la de los estanques familiares en los países tropicales, y otros de más alta tecnología como los sistemas cerrados de producción intensiva para exportación [7].

El cultivo de camarón es una de las producciones que más se han incrementado en la década de los 80 y 90, entre 1999 y 2004 la producción del camarón cultivado se duplicó, pasando de aproximadamente 1 millón de toneladas a unos 2 millones de toneladas según estimaciones Shrimp News International, 2004 [8].

En Ecuador el cultivo de camarón es la principal actividad camaronera y esta domina por el camarón Blanco *Litopenaeus vannamei* y se inició en 1968 desarrollándose principalmente a lo largo de la línea costera, en salitrales, manglares y tierras altas, siendo Santa Rosa de la Provincia del Oro la principal zona camaronera [9].

En la década 70 se expandió en las provincias de Guayas y el Oro en donde la disponibilidad de salitrales y la abundancia de postlarvas en la zona, hicieron de esta actividad un negocio rentable [10].

A mediados de los años 90 la producción siguió avanzando con la creación de nuevas empacadoras, laboratorios de larvas y fábricas de alimentos balanceados y también industrias productoras de insumos para la actividad acuícola.

En mayo de 1999 el cultivo de camarón fue afectado en su producción debido a que este fue atacado por la enfermedad del virus de la Mancha Blanca lo cual

produjo un grave impacto en la economía del país reduciendo las plazas de trabajo.

En el 2000 la producción se redujo un 20% debido a que el sector no se recuperaba del virus de la mancha blanca y solo unas 1200 fincas decidieron continuar con la actividad productiva. Después de haber superado algunas adversidades para el año 2014 el sector cuenta con alrededor de 2000 fincas lo cual hubo un aumento en la producción y en las exportaciones [10].

### **1.2.1 Exportaciones de camarón**

Actualmente el crecimiento sostenido de la acuicultura del camarón ha permitido que sea el segundo producto de exportación no petrolera según estadísticas del Banco central de Ecuador, y la cámara nacional de acuicultura reporta una tasa de incremento en las exportaciones entre el 15-25 % durante el año 2014 [11 ]

Entre los mercados de exportación más importantes del camarón ecuatoriano se encuentran el mercado Europeo y Estados Unidos por tradición, aunque en los últimos años el mercado Asiático ha tenido un incremento considerable, el año 2014 fue el segundo destino de exportación del camarón ecuatoriano, lugar que comparte con EEUU, [11] según la cámara nacional de acuicultura existe la probabilidad que para el 2016 el mercado asiático se convierta en el principal destino de las exportaciones nacionales de Camarón.

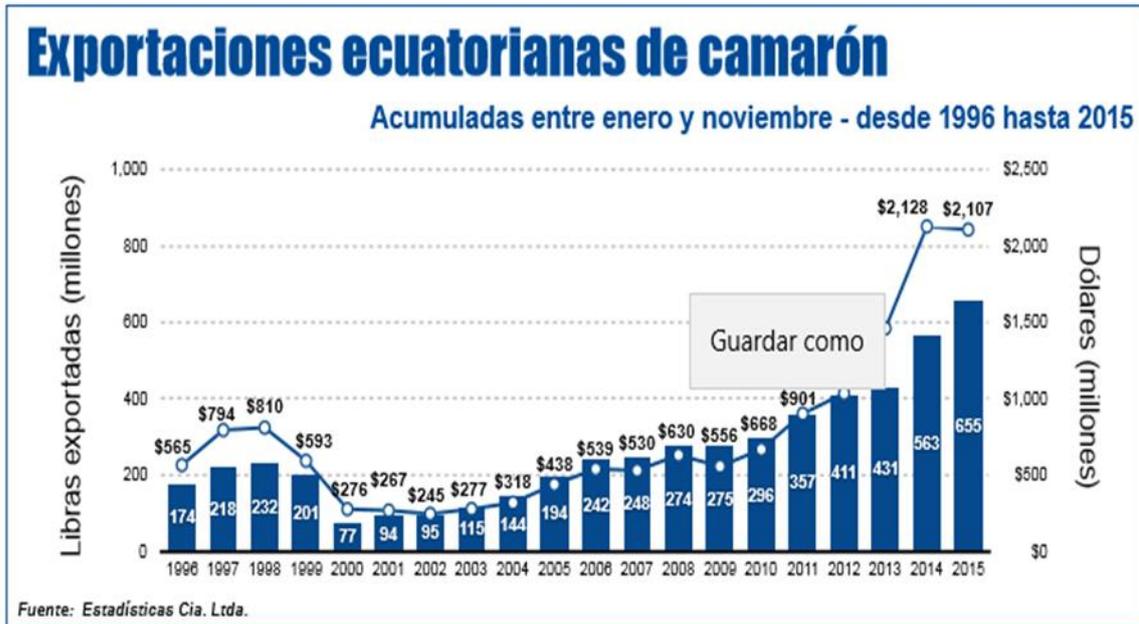


FIGURA 1.2. Exportaciones de camarón del año 1996-2015

Fuente: Revista de la Cámara de Acuicultura [14]

### 1.3. Pesticidas

Los pesticidas o plaguicidas son aquellas sustancias empleadas para combatir las distintas plagas [11] presentes en los cultivos y en la producción agrícola. Estas sustancias pueden ser naturales o sintéticas, presentan diversas características y estructuras químicas las cuales determinan diferencias en su modo de acción, absorción, biotransformación y eliminación de los mismos [9].

Así tenemos aquellas que según su toxicidad aguda pueden ser extremadamente, altamente, moderadamente y ligeramente peligrosos, según su vida media pueden ser permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes, según su estructura química se clasifica en compuestos Organoclorados, Organofosforados, Carbamatos y los piretroides. [13].

Los pesticidas se pueden clasificar de diferentes maneras a continuación se detallan las más relevantes:

### **1.3.1 Pesticidas Según su función**

Se clasifican según el tipo de organismo sobre el que actúan el pesticida para efectuar su acción, los utilizados con más frecuencia en la agricultura son los fungicidas, insecticidas y los herbicidas. A continuación en tabla 1.2 se detalla los más significativos.

**Tabla 1. 2 Clasificación de los Pesticidas según el Agente sobre el que actúan**

<b>PESTICIDAS</b>	<b>ORGANISMOS SOBRE LOS QUE ACTUAN</b>
Insecticidas	Insectos y otros Artrópodos
Fungicidas	Hongos
Herbicidas	Maleza
Acaricidas	Ácaros
Nematicidas	Nematodos – gusanos microscópicos
Bactericidas	Microorganismo de tipo bacteriano
Rodenticidas	Roedores (ratones )

### **1.3.2. Según su estructura química**

Se pueden clasificar de acuerdo a la composición química del principio activo, cada grupo químico puede actuar de manera específica con respecto a la plaga. A continuación se detalla los insecticidas ya que estos son los más numerosos e importantes, ver tabla 1.2.

**Tabla 1.3 Clasificación de los pesticidas según al grupo al que pertenecen**

<b>Grupos químicos (insecticidas)</b>	<b>Características</b>
<b>Insecticidas naturales</b>	Proceden de sustancias químicas naturales(nicotina, rotenona, piretrinas)
<b>Aceites minerales</b>	Obtenidos de aceites derivados del petróleo
<b>Compuestos de origen mineral</b>	Derivados del cobre y del azufre
<b>Organoclorados</b>	Son de amplio espectro, son más persistentes que los organofosforados
<b>Organofosforados</b>	Presentan diferentes formas de actuación, afectan el sistema nervioso, de amplio espectro.
<b>Carbamatos</b>	Amplio espectro hay Específicos para pulgón, mosca blanca y nematodo.
<b>Piretroides</b>	Actúan por contacto e ingestión
<b>inhibidores de la Quitina</b>	Actúan inhibiendo la formación de la quitina, alteran el desarrollo del insecto

### 1.3.3 Según el modo de acción

Según el modo de acción se pueden clasificar de la siguiente manera:

**Tabla 1.3 Clasificación de los pesticidas según el modo de acción**

<b>PESTICIDAS</b>	<b>MODO DE ACCION SOBRE EL PARASITO</b>
<b>Insecticida según la vía de entrada</b>	Por contacto, ingestión, inhalación, repelente, mixtos, adulterados, larvicidas, ovicidas.
<b>Fungicidas</b>	Preventivos, penetrante, curativos o sistemáticos.

### 1.3.4. Según su peligrosidad

Algunos pesticidas son considerados sustancias o preparados peligrosos por sus características químicas, los cuales se pueden clasificar según sus propiedades físico-químicas, sus efectos sobre la salud, y los efectos sobre el medio ambiente.

Tabla 1.4 Clasificación de los pesticidas según su peligrosidad

CLASIFICACIÓN SEGÚN	
Propiedades físico-química	Explosivos, Comburente Inflamables Extra. Inflamable Fácilmente inflamable
Efectos sobre su salud	Muy Tóxicos Tóxicos Nocivos Corrosivos Irritantes Sensibilizantes Carcinogénicos Mutagénicos
Efectos sobre el medio Ambiente(Estas sustancias y preparados pueden presentar un peligro para el medio ambiente inmediato o futuro)	Explosivos Aerosoles inflamables Gases Comburentes

### 1.4. Pesticidas organoclorados

Pertencen al grupo de pesticidas orgánicos sintéticos, generalmente se los utiliza como insecticidas, acaricidas específicos, herbicidas y fungicidas [1].

Estos se clasifican de acuerdo a su estructura química en:

- Derivados halogenados de hidrocarburos alicíclicos
- Derivados halogenados de Hidrocarburos aromáticos
- Derivados halogenados de hidrocarburos ciclodiénicos

Todos los organoclorados son considerados sustancias persistentes, que actúan como veneno del sistema nervioso. Estos son miles de veces más solubles en grasa que en agua. Lo cual significa que tienden a acumularse en tejidos grasos y concentrarse en organismos al tope de la cadena alimenticia (Bioacumulación) [2]. Esta persistencia en el ambiente es debido a su estructura química que es muy estable, estos se degradan lentamente bajo condiciones ambientales extremas, el tiempo promedio de degradación es 5 años, el tiempo de persistencia se encuentra entre 5 a 22 años [1].

Existe un grupo de sustancias de estructura química orgánica o carbónica que son sumamente tóxicas y perdurables en el medio ambiente estas son los llamados **contaminantes orgánicos persistentes COPs**, estas sustancias pueden ser pesticidas, o pueden generarse involuntariamente como subproductos de los procesos industriales y de la combustión.

La mayoría de los **COPs** son compuestos organoclorados los cuales incluye los siguientes plaguicidas: Aldrín, Clordano, DDT, Endrin, Hexaclorobenceno (HCB), Heptacloro, Mirex, y Toxafeno, además de los PCBs, Dioxinas y Furanos, incluidos en la lista de contaminante orgánicos persistentes (COPs) en el año 2004, desde ese tiempo hasta la actualidad se incluyeron otros compuestos OC en la lista así tenemos que en el año 2009 fueron alfa hexacloro ciclo hexano, beta hexacloro ciclo hexano, lindano–Gama hexacloro ciclo hexano, clordecona, pentacloro benceno y el endosulfan en el año 2011.

En el Ecuador las fuentes predominantes de COPs incluyen la agricultura, la energía, la industria y el manejo de desechos, por lo que la población en general puede estar expuesta a la contaminación a través de diferentes medios ambientales y a través de la alimentación. [15]

### 1.4.1 Pesticidas considerados en la tesis

Para este estudio fueron objeto de análisis los siguientes pesticidas organoclorados:

#### 1.4.1.1 Beta hexaclorociclohexano ( $\beta$ -HCH)

El hexaclorociclohexano (HCH) conocido también como hexacloruro de benceno es una sustancia manufacturada está presente en 8 isómeros, una de estas formas es el beta HCH que es el más persistente, en los suelos esta persistencia está determinada por factores ambientales, tales como la acción microorganismos, el contenido de materia orgánica, y el agua, puede permanecer en el aire por mucho tiempo y movilizarse a largas distancia, [16].

Su bioconcentración es rápida en invertebrados, peces, aves y seres humanos en comparación con los otros isómeros, produciéndose bioacumulación a lo largo de la cadena alimentaria y produciendo efectos desfavorables prolongados en el medio acuático, durante exposiciones prolongadas puede afectar al sistema nervioso central, a los riñones y al hígado siendo una sustancia posiblemente cancerígena para el ser humano [16].

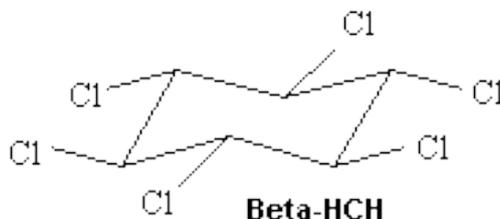


Figura 1.3 Estructura Química del Beta HCH

#### 1.4.2. Aldrín y Dieldrín

Es una sustancia sólida, cristalina, inodora, y blanquecina cuando se encuentra en esta puro, es soluble en compuestos orgánicos grasas, y aceites, es un compuesto que presenta una volatilidad alta y fuente de emisión en la atmósfera se debe a su evaporación en el suelo.

Las plantas y los animales pueden degradar el aldrín a dieldrín el cual es un compuesto químico con estructura similar. El transporte de ambos compuestos se lo realiza por arrastre por el viento (erosión) y por escurrimientos superficiales (transporte de sedimentos), los residuos de aldrín y principalmente del dieldrín pueden persistir por años en el suelo, siendo su persistencia media entre de 4 a 7 años.

Fueron usados como insecticidas desde su fabricación en los años cincuenta hasta la década de los setenta que fue prohibida su fabricación y su uso por considerarse una sustancia peligrosa para la salud y el medio ambiente, estos compuestos son están incluidos en la lista de compuestos orgánicos persistentes (COPs) dentro del convenio de Estocolmo [3]

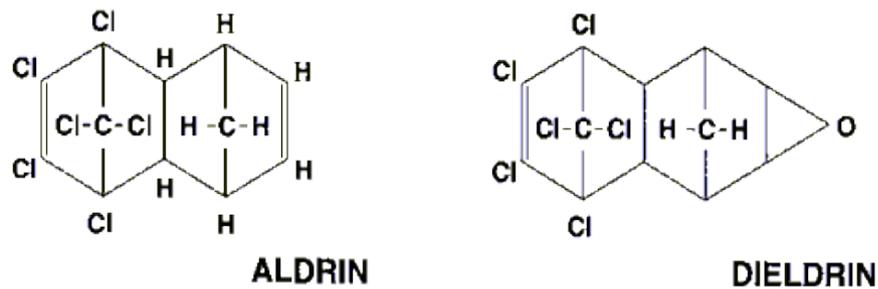


Figura 1. 4 Estructura Química del Aldrín y Dieldrín

### 1.4.1.3 DDT Y DDE

El DDT (dicloro difenil tricloroetano) es un sólido blanco cristalino sin olor o sabor es un insecticida muy soluble en grasas y en compuesto orgánico e insoluble en agua, es bioacumulable a lo largo de la cadena alimentaria.

El DDE (dicloro difenil dicloroetileno) es el metabolito principal de la degradación del DDT, se acumula en tejidos grasos de peces, aves y en plantas.

El DDT y sus metabolitos son persistentes en el medio ambiente pueden permanecer en el suelo principalmente en las capas superficiales, pueden entrar al aire a través de la evaporación del agua y suelos contaminados depositándose en otros lugares, razón por la cual es transportado a largas distancias en la atmósfera,[17], fue usado intensamente en la década de los 40 en la agricultura para controlar plagas de insectos, y específicamente para erradicar el mosquito Anopheles portador de la malaria.

En EEUU en el año 1972 fue prohibido su uso por causar daño a la vida silvestre, y está incluido en la lista de compuestos orgánicos persistentes (COPs) dentro del convenio de Estocolmo. En Ecuador fue usado para combatir tradicionalmente la malaria y en aplicaciones intradomiciliarias desde 1957 hasta 1999 [3].

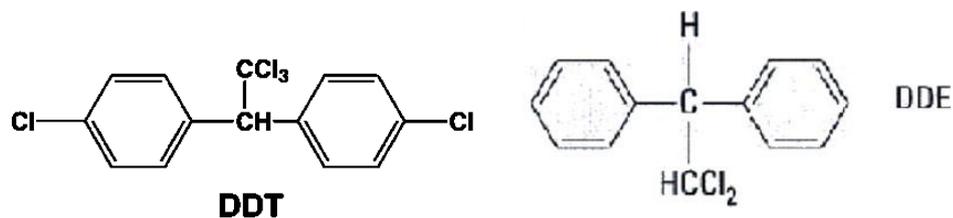


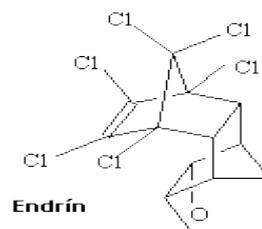
Figura 1.5 Estructura Química del DDT Y DDE

#### 1.4.1.4 Endrín

Pertenece al grupo de los compuestos orgánicos persistentes, es un insecticida muy tóxico es utilizado para combatir una gran diversidad de plagas agrícolas, como el maíz, caña de azúcar, arroz, algodón entre otros, también es utilizado como raticida. Su forma de presentación puede ser en polvo, gránulos, pastas, y como concentrado emulsificante [10].

La aplicación directa de este pesticida en los cultivos ocasiona que este se concentre en los suelos, siendo su persistencia por más de 10 años, puede penetrar en el aire a través de la volatilización y contaminar las aguas superficiales por el escurrimiento del suelo. Es muy toxico para los organismos acuáticos produciendo una bioacumulación en peces y en productos marinos.

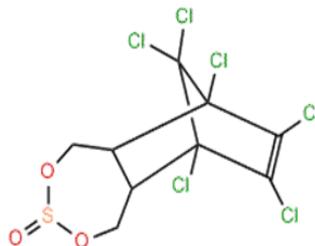
La degradación se puede producir a altas temperaturas de 220°C a la luz, donde se forma cetona de endrina y aldehído de endrina. [18].



**Figura 1.6 Estructura Química del Endrin**

#### **1.4.1.5 Beta endosulfan**

El beta-endosulfan junto con el alfa-endosulfan es isómeros del endosulfan, el cual es un sólido cristalino de color marrón estable a la luz solar pero inestable en medios alcalinos, debido a sus propiedades toxicas y persistentes fue incluido en el año 2011 en la lista de compuestos orgánicos persistentes COPs dentro del convenio de Estocolmo, de sus isómeros el Beta endosulfan es el más estable.[19].

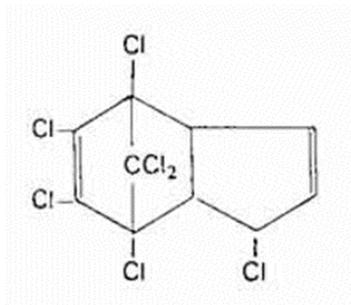


**Figura 1.7 Estructura Química del Beta-Endosulfan**

#### **1.4.1.6 Heptacloro**

El Heptacloro y su epóxido (epóxido de Heptacloro) se presenta en forma de polvo blanco, es estable en presencia de luz, aire, humedad y calor moderado hasta 160° C, son sumamente persistentes en los suelos y no son excesivamente móviles característica por lo cual se los considera un riesgos de contaminación de las aguas subterráneas con el tiempo [11].

Es casi insoluble en el agua y se introduce en aguas superficiales principalmente como resultado de la deriva y de la escorrentías [27]. Presenta tendencia de bioacumulación en organismos acuáticos.

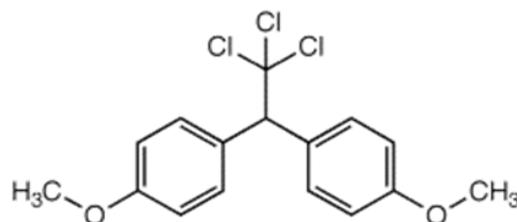


**Figura 1. 8 Estructura Química del Heptacloro**

#### **1.4.1.7 Metoxicloro**

Es un sustancia química de la familia de los clorados se usa para controlar insectos, es eficaz para controlar insectos como moscas, mosquitos, cucaracha y una variedad de otros insectos. Se puede acumular en ciertos organismos por ejemplo, algas, caracoles, almejas y algunos peces y otros animales.

La mayor parte del metoxicloro que ingresa en medio ambiente es consecuencia del uso para matar los insectos, siendo más alta su concentración en el medio en épocas de invierno. [20].



**Figura 1-2 Estructura Química del Metoxicloro**

## **1.5. Disposiciones legales relacionadas con COPs.**

Debido a la toxicidad que presentan los pesticidas organoclorados y especial aquellos pertenecientes al grupo de los contaminantes orgánicos persistentes COPs, su presencia en el medio ambiente, y por ello su fabricación, comercialización y empleo están reguladas por la leyes nacionales e internacionales. En Ecuador según el acuerdo Ministerial No 0112.- publicado en el Registro Oficial No 64 con fecha 12-Noviembre de 1992 los pesticidas COPs están prohibido por ser nocivos para la salud [3].

La constitución de la República del Ecuador, establece en artículo 14 principios y derechos de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir [21], para lo que se han firmado algunos convenios internacionales con el objetivo proteger la salud humana y el medio ambiente las cuales constituyen normas nacionales. El Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes es un tratado internacional que se firmó en mayo del 2001, siendo ratificado por Ecuador el 7 junio del 2004, este convenio contempla medidas que permitan eliminar, y cuando esto no sea posible, reducir las emisiones y las descargas de estos contaminantes [19].

La Unión Europea en el reglamento 396/2005 establece las cantidades máximas autorizadas de residuos de plaguicidas que pueden encontrarse en los productos de origen animal o vegetal destinado al consumo humano o vegetal [21], así también indica para aquellos productos que no se ha establecido el límite máximo residual (LMR), o no están autorizados su uso se ha establecido un límite general por defecto de 0,01 mg/Kg.

La Normativa Ecuatoriana NTE INEN 456 – 2013 (primera revisión) referente a los requisitos para camarones o langostinos congelados, establece LMR de 0.200 y 0.015 mg/Kg para ciertos organoclorados.

### **1.5.1 Normativas referente a los residuos de pesticidas**

Las cantidades máximas de residuos de pesticidas presentes en ciertos productos, se encuentra regulada por distintas normativas con las que se pretende garantizar la inocuidad de los alimentos fijando los límites máximos de residuos (LMR) que no presenten riesgo para la salud y el medio ambiente. La Directiva Europea (CE) y el Codex alimentario no presentan límites máximos de residuos (LMR) de pesticidas COPs para productos camarón o crustáceos, pero presentan límites máximos de compuestos organoclorados en la alimentación animal, lo cual incluye algún pienso para animales acuáticos. Análisis de residuos de pesticidas organoclorados.

El análisis de residuos de pesticidas organoclorados se lo realiza por cromatografía de gases (GC), la muestra no se puede introducir directamente en el sistema cromatográfico debido a su complejidad, ya que estas pueden presentarse muy diluidas o ser incompatibles con el sistema cromatográfico, para lo cual es necesario realizar algunas fases previas que ayudaran a preparar la muestra de forma adecuada para una mejor identificación del analito que se requiere analizar [19].

Estas fases son muy importantes ya que de ellas depende en gran parte el éxito de los análisis, y comprenden las siguientes etapas:

**Recepción y tratamiento de muestra:** Todas las muestras que se reciben en el laboratorio deben contener información sobre origen de las muestras, el análisis requerido y los posibles peligros que puedan contener la manipulación de la muestra en cuestión, para el tratamiento de las muestras y el submuestreo se requiere se utilicen procedimientos donde indiquen la preservación de las mismas para evitar cualquier tipo de contaminación [22].

**2. Extracción de Pesticidas:** En la determinación de residuos de pesticidas se aplica una primera fase que consiste en la extracción de los pesticidas presentes en la muestra, esta se realiza utilizando solventes orgánicos en los que sean solubles los pesticidas que se van a identificar, entre los solventes usados tenemos el benceno, diclorometano, acetona, y acetonitrilo [18].

Entre las técnicas de extracción más utilizadas en los análisis de residuos de pesticidas se puede encontrar: Extracción de partición o liquido-liquido, también llamada extracción con disolventes y Extracción en fase solida (SPE) o de adsorción

**2. Clean-UP:** En esta fase se elimina una serie de compuestos coextraídos en el extracto obtenido ya que estos interfieren en la determinación, es necesario eliminar materiales de la matriz no deseados para obtener cromatogramas más limpios.

#### **4. Determinación /Separación**

La técnica cromatográfica más utilizada en la determinación de residuos de pesticidas organoclorados es la cromatografía de gases. Entre las ventajas que esta técnica presenta se encuentra su alta sensibilidad, posee una detección selectiva, una elevada eficiencia en la separación, análisis rápido, versátil, y se utiliza pequeñas cantidades de muestras para efectuar el análisis [18].

### **1.6.1. Análisis multi-residuos (MMR)**

El método multi-residuos permite la identificación y cuantificación de un amplio rango de pesticidas, así como algunos metabolitos simultáneamente.

La extracción de residuos de pesticidas con técnicas de extracción clásica o con las utilizadas en los últimos tiempos las cuales requieren el uso de menos disolventes orgánicos, conlleva un conjunto de pasos a realizar lo cual requiere tiempo, exposición del analista a solventes peligrosos y elevado costo de reactivos, para evitar estos inconveniente cada vez más se están desarrollando métodos basados en modelos de multi – residuo como los **QuECHERS** (Quick, Easy, Cheap, Effective Rugged Safe).

Actualmente muchas muestras de diferentes tipos de matriz aplican este análisis multiresiduo el cual consiste en una extracción basada en el reparto de

los análisis entre una fase acuosa y solvente que generalmente es acetonitrilo, seguido de una limpieza o purificación de la fase orgánica a través de un proceso de dispersión en fase sólida [17].

Entre las ventajas que presenta este método de extracción podemos indicar que es un método de extracción analítica rápido, efectivo, fácil de reproducir, y con un consumo bajo de solventes no clorados, lo que lo hace más seguro minimizando el número de pasos proporcionando resultados satisfactorias para una amplia gama de compuestos [17].

## **1.7. Cromatografía de gases**

La cromatografía de gases (GC) se fundamenta en que las muestras se separan mediante un proceso de distribución entre una fase estacionaria y fase móvil por adsorción partición o combinación de ambos [23].

Existen dos tipos de cromatografía: la cromatografía gas-sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC), la más utilizada es la cromatografía gas-líquido y se la denomina cromatografía de gases (GC), esta consiste en la separación de los analitos por su diferencia de partición entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida estacionaria.

El instrumento utilizado en análisis por cromatografía de gases es el **Cromatógrafo de gases**, el cual es muy específico para la determinación de compuestos orgánicos, este consta de las siguientes partes:

1. **Fase móvil:** En esta fase el gas portador es un gas inerte de alta pureza como el Helio, Argón, Nitrógeno, el cual lleva las moléculas del analito a través de la columna, la elección del tipo de gas a utilizar depende del tipo de detector que se use.

2. **Sistema de inyección:** Aquí se introduce la muestra en la corriente del gas portador, el inyector es una cámara que se encuentra situada a la entrada de la columna y es calentada independientemente de la columna, la temperatura de inyección debe ser de 10° a 50°C mayor a la temperatura de la columna. La

muestra es inyectada usando una micro jeringa con volúmenes de muestras desde 0.1-10 ul para líquidos y gases 0.5-5 mL, a través de un septum de goma de silicona auto sellante a un linear donde es vaporizada y expulsada hacia la columna [24] [27].

Existe algunas formas de inyección de muestras, el más común es el de inyección directa, también se encuentra la inyección en columnas empacadas y la inyección en columnas capilares, la diferencia entre las técnicas de inyección de las columnas capilares tenemos:

“Split” : La muestra vaporizada y el flujo del gas portador que pasa por el inyector se divide en dos partes, la primera es introducida en la columna y la otra se expulsa del inyector por la válvula Split , la cual sirve para regular el flujo de gas que es introducido en la columna [28].

Splitless: El total de la muestra inyectada es pasada a la columna, donde se condensa en la cabeza de la misma para lo cual actúa el solvente condensado a modo de trampa, luego de transcurrir un tiempo adecuado se abre la válvula de purga para eliminar todos los restos de solvente que se encuentren en el inyector, en forma continua se inicia el programa de calentamiento de la columna para realizar el análisis [24] [28].

**2. Columna:** La columna se encuentra en la parte interna del horno, va conectada a un extremo del puerto de inyección y en el otro extremo al detector. Es necesario que el horno tenga una buena regulación de la temperatura y no debe estar en contacto con las paredes del horno.

Las columnas pueden ser empacadas o columnas capilares hoy en día las más utilizadas son las capilares debido a que estas presenta una gran capacidad de separación [19]. La fase estacionaria es la encargada de separar los componentes de la muestra, esta fase estacionaria puede ser solida o liquida. Estas también se pueden clasificar en no polares, ligeramente polar, y de polaridad media o alta [18] [28]

**4. Detector.** Es un dispositivo que mide los solutos en la corriente del gas acarreador, este convierte la señal no medible en una señal elaborable de una propiedad física, esta señal es traducida a una señal eléctrica la cual es amplificada y registrada al momento de salir de la columna [28].

Los detectores se pueden clasificar en detectores universales y específicos. Los universales responden ante cualquier compuesto químico que eluya de la columna, convirtiéndose en un inconveniente cuando se analizan muestras complejas, mientras que los detectores específicos responden únicamente a un determinado grupo de compuestos, obteniéndose cromatogramas muy resueltos.[28] [27].

Entre los detectores más utilizados en determinación de residuos tenemos el de captura de electrones (ECD), Fotométrico de llama (FPD), el de Nitrógeno-Fosforo (NPD), Ionización de llama (AFID) y espectrofotometría de masas.

Para la detección y determinación de compuestos organoclorados el detector de captura electrones (ECD) es ampliamente utilizado por presentar la ventaja de no alterar la muestras de manera significativa a diferencia del detector de llamas, además de ser un detector selectivo es altamente sensible a moléculas que contiene grupos funcionales electronegativo como halógenos, carbonilos conjugados, nitrilos, nitrocompuestos y compuestos organometálicos [29].

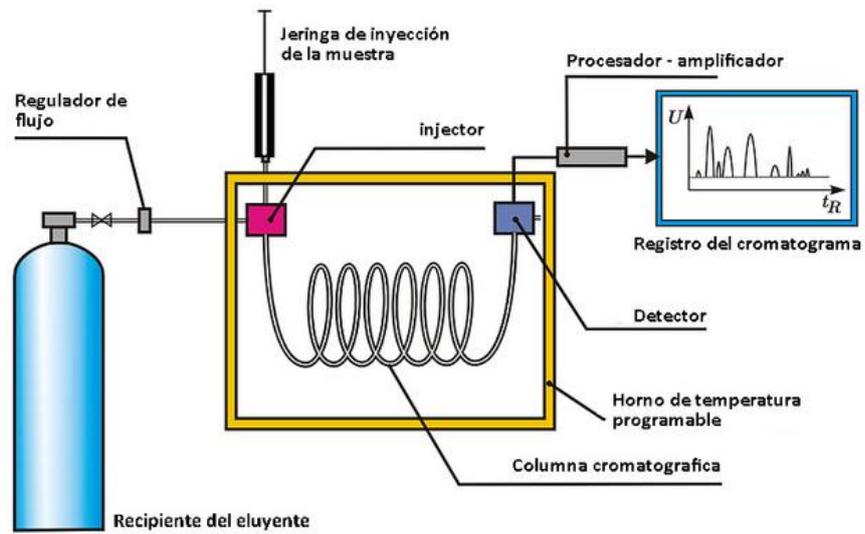


Figura 1.9 Partes básicas de un cromatógrafo de gases.

## **CAPÍTULO II**

### **2. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS**

El aseguramiento de la calidad de los resultados comprende el conjunto de actividades planificadas sistemáticamente para comprobar la validez de los resultados de ensayos. Estas actividades contribuyen a la prevención de errores e incluyen procedimientos de control de calidad para garantizar la calidad de las muestras o lotes de muestras.

Uno de los principales objetivos de realizar el control de calidad es asegurar que los valores obtenidos con un determinado método analítico presentan una adecuada exactitud y precisión.

Entre los diferentes tipos de control de calidad que se efectúan, encontramos control interno de calidad y control de calidad externo, los cuales pueden incluir entre otras, siguientes [29].

#### **Control interno de calidad**

- Control de la función de respuesta instrumental
- Uso regular de materiales de referencia certificados o de control de calidad interno.
- Repetición de ensayos utilizando el mismo método o método diferente.

#### **Control calidad externo**

- Participación en comparación interlaboratorio o programas de ensayos de aptitud.

Para el presente este estudio las pruebas de control de calidad a considerar serán: Control de respuesta instrumental (curva de calibración), duplicados, uso de material de referencia (QC), y participación en pruebas interlaboratorio.

## **2.1. Control de función de respuesta instrumental**

La función de respuesta instrumental se la conoce con el nombre de recta de calibrado, se realiza con soluciones estándares del analito a diferentes concentraciones (mínimo 5 concentraciones) que cubran el intervalo de trabajo del método, el cual se encuentra entre el 50 y 200 por ciento de la concentración del componente que se espera encontrar en las muestras reales [30] cuando los datos se ajustan a una respuesta lineal, es decir a una recta, la ecuación de la función será  $L$  (lectura) =  $m \cdot C$  (concentración) +  $L_0$ , siendo  $m$  la pendiente de la recta de calibrado y  $L_0$  el valor de la ordenada para una concentración cero. Se debe determinar el grado de ajuste de la recta estimada a los valores de  $L$  observados, calculando el grado de determinación  $r^2$  para decidir si es aceptable o no, de acuerdo con condiciones prefijadas [31].

## **2.2. Muestras duplicadas**

Las muestras duplicadas son relativas a los parámetros de precisión del método, el número de muestras a duplicar se determinan de acuerdo a cada lote de trabajo, por ejemplo se duplican al menos 5 % del número de muestras que componen el lote, en números redondeados al siguiente entero. Los resultados que se obtienen de cada duplicado en condiciones de repetibilidad nos van a proporcionar el criterio de aceptación y/o rechazo del lote de trabajo [31].

## **2.3. Uso de blancos**

Según el método de ensayo se determinará el número de blancos que se van a analizar en cada lote de trabajo, siendo al menos uno, este deberá ser tratado como una muestra más de análisis siguiendo todos los pasos del método. En el método se definirá el criterio de aceptación y rechazo, si se encuentra un valor más alto de lo habitual, eso indicará la posible existencia de una contaminación. [31] [30]

## **2.4. Materiales de referencia (MRs)**

El material de referencia es un material o sustancia el cual contiene propiedades suficientemente homogéneas y bien establecidas para ser usada en el aseguramiento de la medición de un método. [31] Estos pueden ser materiales de referencia certificados (MRC) el cual va acompañado de un certificado y una incertidumbre con indicación de un nivel de confianza, y el material de control de calidad (QC) que pueden ser sobrantes de una prueba interlaboratorio, material sobrante que se compra a un proveedor de pruebas interlaboratorio, o Spike (Fortificados) que consiste en adicionar sustancias patrón del análisis que se va determinar a un blanco matriz equivalente a muestras reales [31].

Siempre que sea posible es recomendable realizar un análisis de un material de referencia (MR) en cada lote de trabajo, en las mismas condiciones de análisis.

## **2.5. Pruebas interlaboratorio**

Para conocer la eficiencia de un método y como parte del aseguramiento de la calidad de los resultados obtenidos en un laboratorio, es importante la participación en pruebas interlaboratorio donde se puede medir la exactitud y reproducibilidad del método.

Existe diferentes tipos de ensayo interlaboratorio, estos dependen de los diferentes objetivos que se tengan para realizar estas pruebas [31].

- **Ensayo de estudio colaborativo:** Se realiza cuando el objetivo del ejercicio interlaboratorio es evaluar un método de análisis (validación de métodos).
- **Ejercicio de certificación:** Se realiza cuando el objetivo es determinar el contenido de uno o varios elementos en un material y certificarlo.
- **Ensayos de aptitud:** Cuando el objetivo de la prueba interlaboratorio es evaluar el funcionamiento global del laboratorio.

Los resultados obtenidos de las pruebas interlaboratorio deben ser evaluadas tomando las acciones oportunas que se consideren necesarias.

## **CAPÍTULO III**

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

Para efectuar el análisis de residuos de pesticidas organoclorados en camarón (*Litopenaeus vannamei*) de acuicultura se obtuvieron muestras de diferentes camaroneas ubicadas en las zonas de Huaquillas y Machala de la provincia del Oro, las mismas que fueron proporcionadas por el laboratorio de Análisis Químico y Microbiológico de alimentos del Instituto Nacional de Pesca ubicado en la ciudad de Guayaquil.

La extracción de los residuos de pesticidas organoclorados en camarón, se realizó con la técnica de extracción en fase sólida dispersa (DSPE) y la separación, identificación y cuantificación se llevó a cabo mediante cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC\_ECD).

En este capítulo se describen los reactivos, equipos, materiales e insumos, técnica de extracción, identificación y cuantificación empleados en la investigación.

#### **3.1. Reactivos**

Los reactivos utilizados para el análisis de pesticidas organoclorados en camarón de acuicultura se detallan a continuación:

- Acetonitrilo grado HPLC marca Merck.
- Acetona para cromatografía de gases marca Merck
- Hexano para cromatografía de gases marca Merck
- Ácido Acético grado reactivo marca Merck
- Agua ultra pura (Mili-Q)

### **3.1.1 Gases**

- Gas Nitrógeno grado 5 de 99,999% de pureza, proveedor Indura
- Gas Helio grado 5 pureza de 99,999% de pureza, proveedor Indura.

### **3.1.2 Patrones y materiales de referencia**

- Material de control de calidad (QC), pesticidas residues in oily fish. Fapas
- Estándares certificados de pesticidas organoclorados Mix 2 con una pureza de 97- 99% del Dr.Ehrenstorfer, el cual contiene los siguientes compuestos organoclorados : Aldrín, 4,4 DDD, 4,4 DDE, 4,4DDT, Dieldrín, Alpha-endosulfan, Beta- endosulfan, Endosulfan sulfate, Endrin, Endrin-aldehído, Endrín-Ketone, Alpha-HCH, beta-HCH, gama-HCH, delta.HCH, Heptacloro, Heptacloro-endo-epoxide y Metoxicloro
- Estándares certificados de pesticidas organoclorados Mix B con una pureza de 100% AccuStandard el cual contiene los siguientes compuestos organoclorados: 4,4 DDD, dieldrín, Endosulfan sulfate, Endrin, y Endrín-Ketone,

## **3.2. Materiales**

### **3.2.1 Materiales usados para la extracción**

- Tubos de extracción de fase solida dispersiva QuECHERS, método AOAC, de capacidad de 50 ml suministrado por Agilent Technologies.
- Tubos de 15 ml fase dispersiva (Fatty Sample), AOAC suministrado por Agilent Technologies.

### **3.2.2 Materiales de laboratorio /consumibles**

- Matraces volumétricos de 100 ml clase A.
- Matraces volumétricos de 25 ml clase A.
- Beaker de 10 ml /25 ml.
- Viales de vidrio de 2ml.
- Agitadores magnéticos.
- Agitadores de vidrio.
- Espátulas
- Jeringas descartables de 2 ml
- Tubos de centrifuga graduados de 15 ml .Marca VWR
- Columna\_cromatográfica de 20 metros; ID 0.25 mm, marca Thermo Scientific, procedencia de USA

### **3.3. Equipos**

- Cromatógrafo de gases con sistema de detección de captura de electrones (ECD) con inyector automático modelo master GC/AS marca Dani.
- Balanza Analítica. Marca Denver procedencia de USA
- Centrífuga. Marca eppendorf , modelo 5702
- Vortex. Marca Velp Scientific. procedencia europea
- Baño ultrasonido. Marca VWR procedencia de USA
- Pipeta automática de 5ml. Marca Boeco
- Pipeta automática de 1000 ul Marca Brand

### **3.4. Metodología**

#### **3.4.1. Preparación de soluciones estándares**

▪ **Solución madre**

A partir de una solución estándar Mix de 2000 ng/ul de organoclorados disuelta en tolueno y n-hexano, se preparó soluciones madre de concentración de 20 ppm diluyendo la mezcla con n-hexano grado cromatografía de gases en un matraz volumétrico de 100 ml clase A.

▪ **Solución intermedia**

Se preparó una solución intermedia con una concentración de 400 ppb, partiendo de la solución madre, para lo cual se midió 500 ul de la misma y se llevó a volumen en un matraz volumétrico de 25ml clase A, usando n-hexano como solvente.

Las soluciones de trabajo fueron preparadas a partir de la solución intermedia en 5 niveles de concentraciones de 10, 50, 100,150, y 200 ppb las cuales fueron disueltas en acetona grado cromatografía de gases.

### **3.4.2. Extracción de pesticidas organoclorados**

La extracción y purificación de las muestras se las realizó a través del método QuECHERS que es una extracción en fase solida dispersiva (DSPE) basada en la repartos de los análitos entre una fase acuosa y un disolvente seguido de la purificación de la fase orgánica a través de un proceso de dispersión en fase sólida.

Este método ofrece una alternativa sencilla y rápida a las tradicionales extracciones líquido-líquido y extracción en fase sólida, siendo así un método simplificado para preparación de muestras para el análisis de pesticidas, puede variar dependiendo de los analitos y matriz que se vayan a analizar, para esta investigación el proceso de extracción de los analitos comprendió de dos fases las cuales se detallan a continuación:

**1. Fase de extracción:** Se pesó en tubo de centrifuga de 50 ml  $2g \pm 0,1$  g de muestra de camarón homogenizada, al cual se le agregó 4 ml agua destilada tipo I agitando por 2 minutos, seguidamente se adicionó 5 ml de una solución de acetonitrilo/acético al 1% como disolvente de extracción, agitando la mezcla por 2 minutos en un vortex, luego se agregó a la mezcla 6g sulfato de magnesio y 1,5 g de acetato de sodio que son las sales que contiene el sobre de extracción QuECHERS, agitando en un vortex por 5 minutos hasta obtener una mezcla homogénea, la cual se centrifugo por 15 minutos a 4.400 rpm. El líquido sobrenadante en su totalidad fue transferido a un tubo de centrifuga de 15 ml llevándolo a congelación durante 1 hora.

**2. Fase dispersiva (purificación):** Luego de haber transcurrido el tiempo de congelación se trasvasó toda la fase orgánica obtenida al tubo de limpieza QuECHERS de 15 ml fase dispersiva que contiene 400 mg de Amina Primaria Secundaria (PSA), 400 mg de C18 y 1200 mg de sulfato de magnesio, agitando en un vortex por 5 minutos hasta su completa homogenización, centrifugando por 15 minutos a 4.400 rpm.

Posteriormente se transfirió 500 ul del extracto a un vial de 2ml para proceder a su análisis en el cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones (GC-ECD).

### **3.4.3. Identificación y cuantificación de los analitos**

Para el análisis de multiresiduo de pesticidas organoclorados se utilizó un Cromatógrafo de Gases modelo Master GC/AS DANI, se inyectó 1 ul de las muestras mediante inyector automático con sistema de inyección Split/Splitless y un detector de captura de electrones (ECD).

La separación de los picos se realizó con una columna capilar DB-5 de 20 metros de largo, con diámetro interno: 0.25 mm, Film: 0,25 um como gas carrier se utilizó helio ultrapuro grado 5 con una pureza de 99.999 % y como gas auxiliar para el ECD se utilizó nitrógeno con una pureza de 99.999%.

Las condiciones cromatografías utilizadas durante la identificación de los analíticos de pesticidas organoclorados se detallan en la tabla 2.2 del capítulo 2 de resultados.

#### **3.4.4. Pruebas de Control de Calidad. Diseño Experimental**

Se determinó a través del diseño experimental los parámetros de control de calidad que se utilizaron para determinar que el método de análisis desarrollado fue confiable y funcional a las condiciones del laboratorio y asegurar la confiabilidad de los valores obtenidos por medio de una adecuada exactitud y precisión, por lo que se evaluó los siguientes parámetros:

- ✓ Control de respuesta instrumental (curva de calibrado): se realizó seis niveles de concentración con los patrones de pesticidas para cada uno de los compuestos investigados.
- ✓ Duplicados: Por cada 20 muestras del lote de análisis se realizó un duplicado.
- ✓ Uso de materiales de referencia: se pasó por cada lote de trabajo un material de control de calidad (QC) con el cual se comprobó la exactitud de los resultados obtenidos.
- ✓ Participación en pruebas interlaboratorio: Se participó en una prueba interlaboratorio (FAPAS), bajo las mismas condiciones de trabajo utilizadas, durante el análisis de los pesticidas organoclorados de investigación.

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presenta los principales resultados del análisis realizado a 50 muestras de camarón procedentes de diferentes camaroneras de las zonas de Puerto Bolívar y Huaquillas de la ciudad de Machala provincia del Oro, también se detalla las diferentes pruebas de análisis de control de calidad que se efectuaron durante la corrida de las muestras. La figura 4.1 indica la procedencia de las muestras con su respectiva codificación y el número de muestras analizadas.



**Figura 4.1** Procedencia de muestras analizada

Fuente: Google maps. Elaborado: por el autor

## 4.1. Optimización del método de extracción

Como en todo procedimiento de extracción de fase sólida (SPE) son varios los parámetros que hay que optimizar como fase estacionaria, pH, volumen de muestra, y tipo - volumen de disolvente, debido a la complejidad de la matriz camarón, las pruebas preliminares para la optimización del método de extracción consistieron en realizar extracciones a diferentes volúmenes de agua y de solvente de acetonitrilo – ácido acético 1% con la finalidad de ver si existe alguna diferencia en la recuperación de los analitos de estudio.

En la Figura 4.2 se observa un cromatograma a diferentes volúmenes del solvente de extracción de ACN- ac. acético al 1%, donde se puede observar que con 5ml de solvente obtenemos buenas extracciones para la mayoría de los compuestos estudiados, seleccionándose ACN- ac. acético al 1% a este volumen como solvente de extracción.

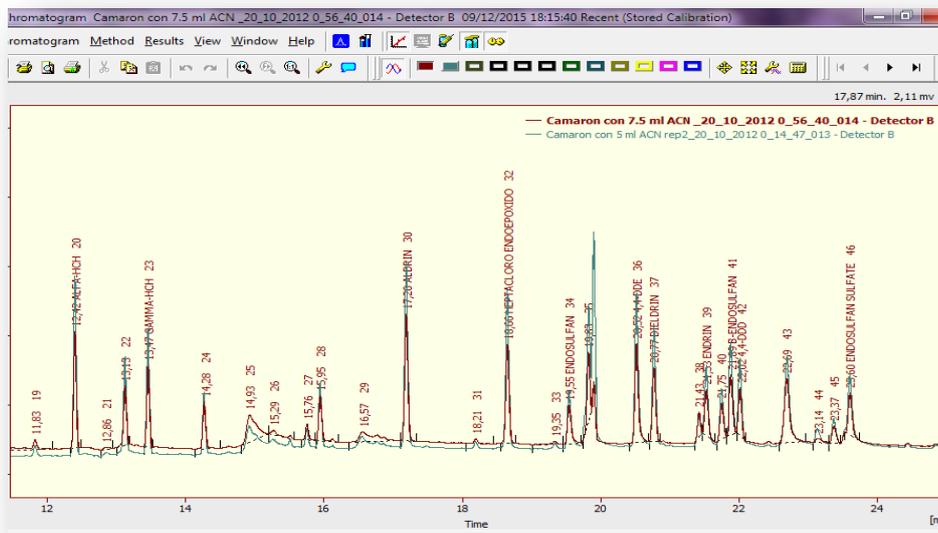


Figura 4.2 Cromatograma a diferentes Volúmenes de Extracción

La etapa de extracción es muy importante en el análisis de alimentos debido a la complejidad de la matriz y a la cantidad baja de niveles de contaminantes que se puedan encontrar en las muestras, el método de extracción QuEChERS ofrece ventajas de alta recuperaciones, resultados precisos, rápido tratamientos de las muestras y bajo uso de solventes no clorados [32], se usó como solvente acetonitrilo siendo este uno de los más usados debido a que este permite la extracción del rango más amplio de compuestos orgánicos, y es muy compatible con GC/ECD o MS mostrando las menores interferencias.

## **4.2. Condiciones Cromatográficas**

Para la identificación y cuantificación de los pesticidas organoclorados se buscó las condiciones óptimas de operación cromatográfica para lo cual se realizó algunas pruebas de rampas de temperaturas y flujos de purga, quedando establecidas la detalladas en la tabla 4.1 donde indica las condiciones cromatográfica con la cual se consiguió mejores resultados en la separación de los picos de cada análito y tiempo de corrida del análisis de multiresiduo de pesticidas OC en camarón.

**Tabla 4.1 Condiciones Cromatográficas**

<i>HORNO</i>	
Temperatura	1: 110°C 5.00 min. 2: 280°C 2.00 min.
Rampas	Tiempo Total de corrida: 42 min.
<i>COLUMNA</i>	
Gas carrier	Helio
Diámetro	0.25 mm
Largo	20 metros
Espesor:	0.25 um
<i>INYECTOR</i>	
Temperatura	260°C
Flujo	1.00 ml/min.
<i>DETECTOR ECD</i>	
Temperatura Gas auxiliar	200°C Nitrógeno

En el anexo C, se adjunta una figura de las rampas de temperaturas y flujos de purga que se probaron para establecer la condiciones Cromatograficas.

La temperatura del inyector depende del componente que se vaya a determinar por lo general es calculada a una temperatura superior del punto de ebullición del componente más volátil de la muestra de estudio, de los métodos consultados las temperatura de inyección utilizadas oscila entre 220°C y 260°C, para este estudio se consideró a 260°C la cual nos dio una buena resolución y altura de los picos, así mismo se probaron flujo de gas carrier (helio) a 1ml y 2ml lo cual no hubo una diferencia en la resolución de los picos, por lo que se escogió 1 ml/min, lo cual ayuda al ahorro significativo en el consumo de gas.

### **4.3. Identificación de pesticidas de estudio**

La Identificación de los pesticidas OC se obtuvo en base al tiempo de retención (TR), que es el tiempo transcurrido entre el instante en que se inyecta la muestra y el instante en que se detecta la señal propia del componente.

Se realizó un análisis multiresiduo utilizando una solución estándar que contenía 18 pesticidas organoclorados obteniéndose los tiempos de retención de cada uno de los pesticidas. En la tabla 4.2 se puede apreciar los 9 pesticidas organoclorados con los tiempos de retención y orden de aparición para cada análisis de interés de este estudio.

**Tabla 4.2 Tiempo de retención y orden de aparición de Pesticidas OC**

<i>Pesticida Organoclorados</i>	<i>Tiempo de Retención</i>	<i>Orden de aparición</i>
Beta-HCH	19.24	2
Aldrín	22.65	5
4,4 DDE	27.00	8
Dieldrín	27.16	9
Endrin	27.85	10
B-endosulfan	28.18	11
4,4 DDT	29.62	15
Heptacloro	20,98	16
Metoxicloro	21,44	17

#### **4.4. Pruebas de control de calidad**

Se efectuaron las siguientes pruebas de control de calidad para la determinación de pesticidas organoclorados.

##### **4.4.1. Curva de Calibración:**

Una vez establecidas las condiciones Cromatográficas se efectuó curvas de calibración para cada pesticida en estudio, a partir de la dilución del estándar mix con concentraciones de 10, 50, 100, 150 y 200 ppb. Se determinaron los índices de linealidad ( $R^2$ ) para cada análito pudiéndose observar en la tabla 4.3 valores de  $R^2$  de 0.98 a 0.99, lo cual nos indica la respuesta lineal del equipo para cada uno de los compuestos.

Tabla 4.3 R<sup>2</sup> de las curvas de calibración de cada pesticida.

PESTICIDAS	R <sup>2</sup>
Beta-HCH	0.9997
ALDRIN	0.9999
4,4 DDE	0.9998
DIELDRIN	0.9999
ENDRIN	0.9904
B-ENDONSULFAN	0.9992
4,4 DDT	0.9982
HEPTACLORO	0.9840
METOXICLORO	0.9892

Para establecer la relación lineal de las curvas de calibración se efectuó una representación gráfica con la cual, se obtuvo la ecuación de la recta, pendiente y coeficiente de determinación, como se observa en la figura 4.3 para la curva de calibración del compuesto aldrín.



Figura 4.3 Curva de calibración del Aldrin

Las curvas de calibración con sus respectivas ecuaciones y gráficos de cada uno de los compuestos organoclorados identificados para este estudio se encuentran en el anexo B.

#### 4.4.2. Blanco y Duplicado

Durante cada lote de análisis de 25 muestras se corrió un blanco reactivo y un duplicado al azar del lote análisis, la figura 4.4 indica un cromatograma de un duplicado de una muestra de camarón de estudio.

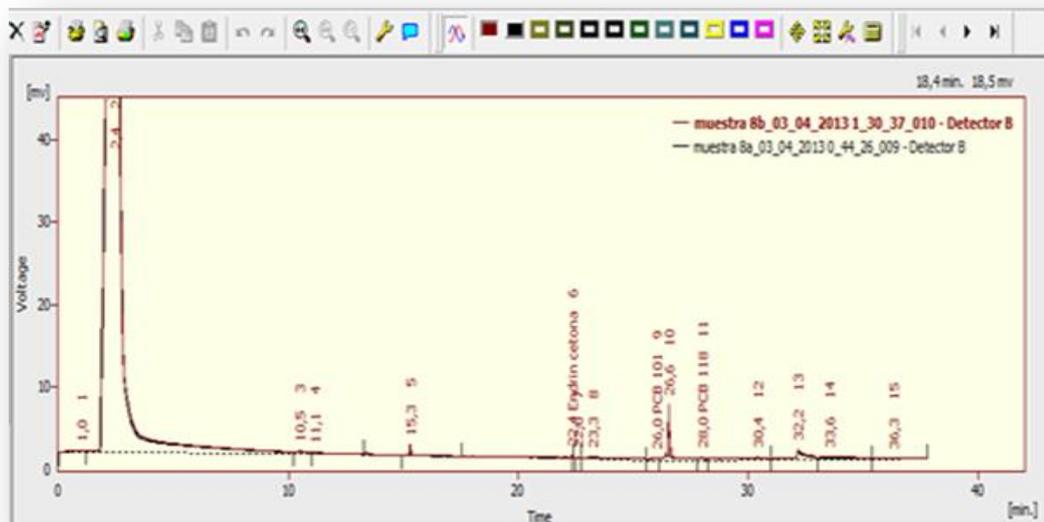


Figura 4.4 Cromatograma del análisis multiresiduo en camarón por duplicado

El objetivo de correr un blanco reactivo durante el análisis consiste en poder identificar alguna contaminación del reactivo o de la columna para lo cual indispensable verificar que el Cromatógrafo se encuentre en óptimas condiciones de uso.

### 4.4.3. Ensayos de Recuperación

Para el ensayo de recuperación durante la corrida de pesticidas OC en camarón se utilizó durante el lote de trabajo un material de control de calidad (QC) con lo cual se comprobó la exactitud de los resultados obtenidos, la muestra de control de calidad solo contenía el análito 4,4 DDE obteniendo resultados de recuperación de 114% y un z score < 2 lo cual indica que los resultados se encuentran satisfactorio, los cálculos de dicha prueba se encuentran en el anexo A. En la figura 4.5 se observa el cromatograma del material de control de calidad que se utilizó durante el análisis.

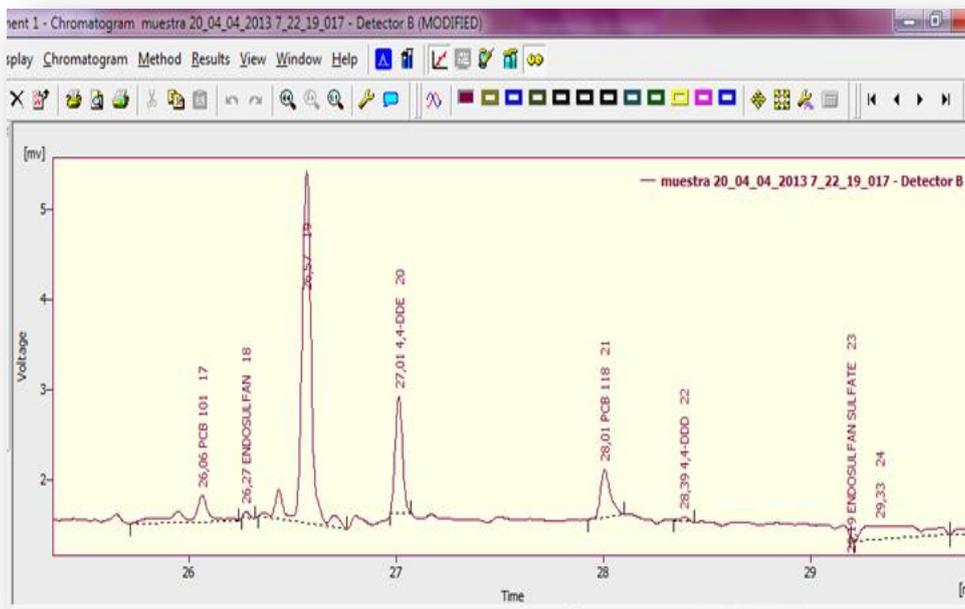


Figura 4.5 Cromatograma del material de control de calidad

### 4.4.4. Prueba Interlaboratorio

Se participó en una prueba interlaboratorio (FAPAS), el método de extracción y las condiciones cromatograficas utilizadas fueron las mismas que

se desarrollaron para la determinación de pesticidas organoclorados en las muestras de camarón.

Los resultados obtenidos se muestran en Figura 4.6 donde se puede apreciar que dicha prueba solo contenía dos análisis 4,4 DDE y Beta HCH, obteniendo un z- score menor a 2, lo que indica que los resultados se consideran exactos y precisos.

Para conocer que tan disperso pudo estar el valor entregado se utiliza una herramienta estadística conocida como **puntaje z** o el **z- score** en inglés. El cual es una herramienta aceptada internacional para la evaluación del desempeño del laboratorio dentro de rondas interlaboratorio para parámetros cuantitativos.

Se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$z_i = \frac{x_i - \hat{\mu}_a}{\hat{\sigma}}$$

Donde  $\hat{\mu}_a$  es el estimador del **valor asignado** (ej. promedio o mediana);  $\hat{\sigma}$  es el **estimador de la dispersión de resultados** (desviación estándar). X es el valor entregado por el laboratorio

Dependiendo del z-score calculado para cada laboratorio, se establece su desempeño como se indica a continuación:

$ z  \leq 2$	Resultado Satisfactorio
$2 <  z  < 2$	Resultado Cuestionable
$ z  \geq 2$	Resultado Insatisfactorio.

Table 1 (continued): Results and z-Scores for DDE-pp, HCH-beta and Thiacloprid

laboratory number	analyte											
	DDE-pp assigned value 103 µg/kg				HCH-beta assigned value 109 µg/kg				Thiacloprid assigned value 103 µg/kg			
	result µg/kg	recovery %	LoQ µg/kg	z-score	result µg/kg	recovery %	LoQ µg/kg	z-score	result µg/kg	recovery %	LoQ µg/kg	z-score
040	130		10	1.2	137		10	1.2	#			
041	90.5	107.9	50.0	-0.6	<LOQ	110.5	50.0		#			
042	54.3	42	5	<b>-2.2</b>	101.1	85	5	-0.3	134.2	114	5	1.4
043	2	19	50	<b>-4.5</b>	259	80	50	<b>6.2</b>	#			
044	#				91.12	80	10	-0.8	#			
045	123	107	10	0.9	178	112	10	<b>2.9</b>	76	98	10	-1.2
046	100	68	5	-0.2	120	70	5	0.4	110		10	0.3
047	109	106	5	0.2	111	92	5	0.1	92.2	71	10	-0.5
048	106		0.010	0.1	103		0.010	-0.3	#			
049	123	101	10	0.9	95	76	10	-0.6	#			
<b>050</b>	73.70	60	10	-1.3	97.82	60	10	-0.5	#			
051	95	64	5	-0.4	135	84	5	1.1	#			
052	42	85	10	<b>-2.7</b>	0	71	10	<b>-4.5</b>	#			

# = pesticide not analysed for z-scores outside |z| >2 are shown in **bold**, see Section 5 *italics indicate for information only*

Figura 4.6 Resultados del análisis de camarón en la prueba interlaboratorio Fapas Fuente: Reporte de la Participación en la Prueba Interlaboratorio. www.fapas.com

#### 4.5. Cuantificación de compuestos organoclorados

A cada extracto de camarón se realizó la identificación cromatográfica de cada uno de los pesticidas de investigación, cuyos tiempo de retención fueron comparados con los tiempos de retención de cada uno de los patrones de los pesticidas organoclorados.

Se analizaron 25 muestras de zona de Puerto Bolívar y 25 muestras de la zona de Huaquillas, en la tabla 4.4 se observa los resultados obtenidos para el análisis de camarón de acuicultura en la zona A que es Puerto Bolívar y en la tabla 4.5 se indican los resultados de la zona B que pertenecen a Huaquillas.

Tabla 4.4 Concentraciones de pesticidas Organoclorados en camarón de acuicultura

**ZONA A PUERTO BOLÍVAR**

Muestra	Pesticidas Organoclorados								
	BETA -HCH	ALDRIN	4,4 DDE	DIELDRIN	ENDRIN	ENDOSULFAN	4,4 DDT	HEPTACLORO	METOXICLORO
A1	<1 Oppb	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
A2	<1 Oppb	N.D	N.D	N.D	N.D	<1 Oppb	N.D	N.D	N.D
A3	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
A4	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	<1 Oppb	N.D	N.D	N.D
A5	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	<1 Oppb	N.D
A6	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	<1 Oppb	N.D	N.D	N.D
A7	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
A8	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
A9	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
A10	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
A11	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	<1 Oppb	N.D	N.D	N.D
A12	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
A13	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
A14	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
A15	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
A16	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
A17	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
A18	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
A19	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
A20	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
A21	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
A22	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
A23	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
A24	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
A25	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

N.D = No detectable  
<10 ppb= Menor al primer punto de la curva de calibración.

Tabla 4.5 Concentraciones de Pesticidas Organoclorados en camarón de acuicultura

**ZONA B HUAQUILAS**

Muestra	Pesticidas Organoclorados								
	BETA -HCH	ALDRIN	4,4 DDE	DIELDRIN	ENDRIN	B-ENDOSULFAN	4,4 DDT	HEPTACLORO	METOXICLORO
B1	<1 Oppb	N.D	N.D	N.D	N.D	<1 Oppb	N.D	N.D	N.D
B2	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B3	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B4	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B5	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B6	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B7	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B8	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B9	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B10	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B11	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B12	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B13	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B14	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B15	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B16	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B17	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B18	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B19	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B20	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B21	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B22	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B23	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B24	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
B25	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

N.D = No detectable  
<10 ppb= Menor al primer punto de la curva de calibración.

## **4.6. Evaluación de los resultados obtenidos**

De las muestra analizadas 9 presentaron áreas pequeñas de los siguientes pesticidas: Beta HCH, Heptacloro, endosulfan, y B-endosulfan, estos valores estuvieron por debajo de 10 ppb, que es el punto más bajo de la curva de calibración para el análisis de pesticidas organoclorados en camarón, desarrollado en el laboratorio donde se realizó el análisis, las muestras restantes presentaron resultados **No Detectable**.

Los resultados obtenidos no sobrepasan los límites máximos de residuos (LMR) declarados por las normativas nacionales e internacionales.

Las normativas europeas establecen límites máximos de residuos de plaguicidas para productos alimenticios y para pienso en animales, y para aquellos pesticidas que nos tienen establecido o no se menciona específicamente el LMR se aplica un límite máximo de residuo general por defecto de 0,01 mg/kg (10 ppb) [21], en la normativa del Códex Alimentarius y normativas de la comunidad Europea no se ha establecido límite máximo residual (LMR) para el producto camarón.

La normativa ecuatoriana INEN 456/2013 establece para camarones o langostino congelados límites máximos de residuos de los productos aldrín, y DDT de 200 ppb, estando los resultados obtenidos por debajo de estos LMR, para los demás compuestos de estudio en esta norma no se encuentra establecidos LMR.

## **4.7. Discusión**

La técnica de análisis empleada para la obtención de los resultados de la investigación, permitió realizar el análisis confiable a través de pruebas de control de calidad, las cuales verificaron la confiabilidad del método desarrollado.

La metodología multiresiduo usada nos permitió la identificación y cuantificación de 9 pesticidas organoclorados en una sola corrida.

Dentro de los resultados obtenidos la mayoría de ellos son similares a investigaciones anteriores realizadas en camarones blancos cultivados en laboratorio en Guadalajara-México Marmolejo, 1999 donde no se encontró presencia de plaguicidas.

Estudios realizados en otros países [33] en camarones de acuicultura, las concentraciones encontradas fueron no detectables (N.D) o menor al límite permitido por la norma nacional del país donde se realizó la investigación.

A continuación la tabla 4. 6 se detalla las investigaciones realizados por otros autores en camarón.

**Tabla 4.6 Resultados de análisis de pesticidas de otras investigaciones**

<b>AUTOR Y AÑO</b>	<b>TEMA</b>	<b>MUESTRA Y LOCALIZACIÓN</b>	<b>RESULTADOS</b>
Ana Judit marmolejo Rodríguez\1999 México	Determinación cuantitativa de la presencia de plaguicidas organoclorados en camarones blancos adultos cultivados y madurados en laboratorio bajo condiciones controladas	Lugar: laboratorio de ciencia /Guadalajara/México  Muestra: camarones de laboratorio	No se encontró presencia de plaguicidas
Beatriz Jaramillo/María Patricia Marrugo/2010 Colombia	Determinación de la contaminación residual de pesticidas organoclorados en músculo de camarón obtenidos en las playas de la ciudad de Cartagena.	Lugar: playas de la ciudad de Cartagena /Bahía de Cartagena /Colombia  Muestra: músculo de camarón	La concentración de residuos de pesticidas en camarón fue más baja que la del límite máximo permitido en animales acuáticos recomendados por la FAO
Lucia Rueda – Alfonso V Botello-Gilberto Díaz México	Información actualizada sobre los niveles de pesticidas en el sedimento y biota (camarón y pescado)de la lagunas de Chiapas	Lugar: Sistemas lagunares del estado de Chiapas ,México  Muestra: sedimento camarón y peces  :	Presencia de ciertos pesticidas como DDD y Heptacloro en el músculo de camarón

## **5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **CONCLUSIONES**

- Se implementó y optimizo un método de ensayo multiresiduo para la determinación o evaluación de pesticidas organoclorados para camarón mediante cromatografía gases con detección de captura de electrones (GC-ECD).
- Se implementó un método de extracción QuEChERS el cual es sencillo y rápido en comparación con las tradicionales extracciones liquido-líquido o fase sólida, obteniéndose buenos resultados durante la identificación de los análisis de estudio.
- Para evaluar y como parte del aseguramiento de la calidad dentro del método de análisis de pesticidas organoclorados utilizado en el análisis de camarón objeto de este estudio de investigación, se participó con un organismo internacional de alto reconocimiento FAPAS, acreditado bajo la norma ISO 17042, los resultados obtenidos a través de este prueba se consideran satisfactorios con un resultado de z-score <2 lo que indica que son exactos y precisos verificando así que el método es confiable.
- De los 9 pesticidas organoclorados evaluados, el B-HCH y el Beta-Endosulfan dieron concentraciones muy bajas menores a los límites permitidos para alimento animal para camarón, límites de residuos en matriz camarón no se ha establecido el límite máximo residual (LMR)
- Los pesticidas Aldrín, 4,4 DDE, Dieldrín, Endrin, 4,4 DDT, Heptacloro, todos estos considerados dentro del grupo de compuestos orgánicos persistentes y prohibidos dieron resultados NO DECTABLES, igual que

el Metoxicloro que también presento resultados NO DETECTABLES. Por lo que de manera general se podría indicar que las muestras de camarón evaluadas se encuentran “**libre de presencia de pesticidas organoclorados**” en los análisis identificados en este estudio.

- Se logró a través del desarrollo de este método el fortalecimiento de las capacidades analíticas del laboratorio de Análisis de Química de alimentos de la autoridad competente del Instituto Nacional de Pesca.
- A través de este estudio de investigación se logró obtener información sobre la presencia de pesticidas organoclorados en camarón de acuicultura, la cual ayudaría a establecer un línea base de algunos compuestos considerados de alta toxicidad y si existe o no influencia en la industria de camaronera.

## **RECOMENDACIONES**

- Es importante que se aumenten los estudios sobre la persistencia de los plaguicidas organoclorados en especial los que pertenecen al grupo de los COPs, en diferentes productos de la pesca, lo cual ayudaría a obtener una base de datos sobre la posible presencia de estos contaminantes que afectan la salud humana.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

1. Arata de Bellabarba , G. 2011. Contaminantes Orgánicos Persistentes (Cops):Qué son y Como afectan el medio ambiente y la salud. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*,vol. 9,), pp 24-26. Recuperado el 27 de Marzo de 2015, de Disponible en: <<http://www.scielo.org.ve/scielo.ph>.
2. FAO. (s.f.). 2015. Acuicultura principales conceptos y definiciones. Recuperado el 09 de julio de 2015, de <http://www.fao.org/spanish>.
3. OMS. 1989. Guia para la salud y la seguridad #21 Aldrin-Dieldrin.PISSQ.Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Quimicas. Mexico.1989 ISBN9241542-4.  
[www.bvsde.paho.org/bvsacd/eco/002561.pdf](http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/eco/002561.pdf).
4. Instituto nacional de Pesca . Jorge Correa. 1992. Crustaceos de Mayor Importancia Comercial en Ecuador. *Catalogo*, 15-20. Guayaquil, Guayas, Ecuador.
5. ESPOL. Ministerio de Ambiente.2005. Gestión de la Sustancias químicas del Ecuador. Perfil Nacional .Quito-Ecuador.
6. Camara Nacional de acuicultura. 2015. China un Mercado Necesario para el Camarón Ecuatoriano. *Revista Acuicultura edicion # 106*,pag 48-52.
7. J.Syanna Dayal, AG Panniah. H. Imran Khan. 2015. Camarón una Perspectiva Nutricional, *Revista Acuicultura edicion # 106*,pag 48-52,
8. FAO. (s.f.). 2010. Acuicultura principales conceptos y definiciones. Recuperado el 09 de julio de 2015, de <http://www.fao.org/spanish>.
9. FAO. 2012. Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura . <http://www.fao.org>. Recuperado el 2014, de <http://www.fao.org/icatalog/inter-e.htm>.
10. FAO. (s.f.). 2005. *Visión General del Sector Acuicola Nacional-Ecuador*. Departamento de Pesca y Acuicultura, Roma. Recuperado el 15 de Marzo de 2015, de [http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso\\_Ecuador/es](http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_Ecuador/es).

11. FAO. (s.f.). 2005. *Evaluación de la contaminación del suelo .Manual de referencia* Departamento de Pesca y Acuicultura, Roma. Recuperado el 15 de Marzo de 2015, de [http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso\\_Ecuador/es](http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_Ecuador/es).
12. Isern, M. D. 2002. *La Química de los Pesticidas y su Metodología Analítica*. Rosario, Argentina: UCEL. Recuperado el 16 de Mayo de 2014.
13. Font, G., Fernandez, M., Ruiz, M., & Pico, Y. (s.f.). *Residuos de Plaguicidas en Alimentos*. En A. Cameán , & M. Repetto, *Toxicología Alimentaria* (pág. 2012). Madrid: Ediciones Diaz de Santos. Recuperado el Febrero de 2015.
14. Camara Nacional de acuicultura. *China un Mercado Necesario para el Camarón Ecuatoriano*. Revista Acuicultura edicion # 110,pag 50-51, 2015.
15. Montaña Armijos Mariano. Ministerio de Ambiente . *Informe Línea base de los contaminantes orgánicos persistentes (cops) en la matriz aire del Ecuador*. Abril 2012.
16. ICSC: 0796. *Ficha Internacional de Seguridad Química de Beta-hexaclorociclohexano*. Noviembre 2009.
17. Codex Alimentarius. *Directrices Sobre Buenas Prácticas de Laboratorio en el Análisis de Residuos de Plaguicidas*. Disponible [www.codexalimentarius.org](http://www.codexalimentarius.org).
18. Fernández Fernández et al., M. 2012. *Aplicación de Plaguicidas. Nivel Cualificado* (2012 ed.). (p. y. Consejería de la Agricultura, Ed.) Sevilla, España. Recuperado el 6 de Enero de 2015.
19. Convenio de Estocolmo, 2010. *Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP) enmendado en 2009*. Disponible en: [http://www.wipo.int/edocs/trtdocs/es/unep-pop/trt\\_unep\\_pop\\_2.pdf](http://www.wipo.int/edocs/trtdocs/es/unep-pop/trt_unep_pop_2.pdf).
20. ICSC: 1306. *Ministerio de trabajo de España*. 2004. *Ficha Internacional de Seguridad Química del Metoxicloro*.
21. *Reglamento (UE) N° 396/2005. Relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal*.2005.pp.1-5
22. Banco central del Ecuador. 2014. *Información Estadísticas Mensual N° 1946 exportaciones por grupo*. informe estadístico, Guayaquil. Recuperado el Abril de 2014.
23. Olguín Laura, Rodríguez Héctor.2004. *Universidad Autónoma de México. Métodos en Biotecnología, Cromatografía de Gases, Instituto de Biotecnología. México*

24. Ramirez, J.A & Lacasaña. 2001. *Plaguicidas : Clasificación , Uso, Toxicología y Medición de la Exposición*, 4 (2) 67-75.
25. OMS. 1989 .*Guía para la salud y la seguridad #21 Aldrin-Dieldrin. Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas. Mexico.1989 ISBN9241542-4. www.bvsde.paho.org/bvsacd/eco/002561.pdf*
26. OMS .Mexico 1989. *Guía para la salud y la seguridad #52 Alfa y Beta hexaclorociclohexano. PISSQ. Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas.ISBN 9241542-4.*
27. Ramirez Olga Isabel Trujillo. 2006. *Análisis de Pesticidas por Cromatografía de Gases* (primera edición ed.). (U. N. Colombia, Ed.) Manizales.
28. Hernandez F. Beltrán J. Análisis de residuos de plaguicidas en Aguas. Grupo de investigación del medio ambiente y recursos naturales.Universidad Jaime I Castellón. España 1995. pp 221-255.
29. N.T.E *Inen-iso/iec 17025:2006 requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. capítulo 5.9.*
30. Rodriguez Oswaldo, Velázquez Laura, Soto Sonia del Carmen, Rodríguez Guillermo. Development and Validation of an Analytical Method for the Detection and Quantification of Organ chlorine Pesticides in Pork Fat With a GC/PTV/EI/MS2 system. *Revista veterinaria de México. Vol. 42 N°2 www.scielo.org.*
31. Asecal - Corpei.Noviembre de 2006 Evaluación de la Calidad de los Ensayos en Laboratorios Químicos .*Manual* . Guayaquil, Guayas, Mexico.
32. Conapesca/ISA.2009. Plan maestro de camarón de Altamar del estado de Sinaloa. pagina 7-8.
33. Jaramillo, Beatriz e, Marrugo, María Patricia, & Duarte, Edisson. 2010. Monitoreo de Residuos de Pesticidas Organoclorados en Camarón (*Penaeus Vannamei*) del Área Costera de la Bahía Cartagena (Colombia). recuperado en 16 de enero de 2014, de <http://www.scielo.org.co/scielo>
34. Cromlal S.L. QuEACHERS. 2000. Manual de información sobre Método de Extracción en Fase Solida de Pesticidas. Manual de Información. pag 2-5.
35. FAO. (s.f.). 200. *Evaluación de la contaminación del suelo .Manual de referencia* Departamento de Pesca y Acuicultura, Roma. Recuperado el 15 de Marzo de 2015, de [http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso\\_Ecuador/es](http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_Ecuador/es).

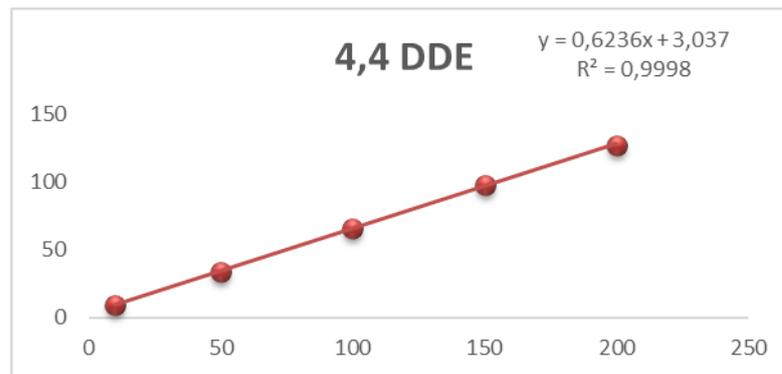
36. FAO. (s.f.).2005. *Visión General del Sector Acuícola Nacional-Ecuador*. Departamento de Pesca y Acuicultura, Roma. Recuperado el 15 de Marzo de 2015, de [http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso\\_Ecuador/es](http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_Ecuador/es).
37. FAO. 2011. *Orientaciones Tecnicas para la Pesca Responsable.Desarrollo de la Acuicultura*. Roma, Italia. Recuperado 2014<http://www.fao.org/docrep>.
38. FAO. Aquaculture topics and activities. (Actualizado 2014). <http://www.fao.org>. Recuperado el 8 de Marzo de 2015, de <http://www.fao.org/fishery>.
39. FAO.2000Manual para el Control de Calidad de los alimentos. <http://www.fao.org>. Recuperado el 2014, de <http://www.fao.org/icatalog/inter-e.htm>.
40. A.Rubinson. 2001. Análisis Instrumental .Capitulo 14 -15 pg 540-696.
41. Sagarpa. 2002. Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de camarón para la Inocuidad Alimentaria. *Primera Edición*. Mexico. Recuperado el 2014.
42. Camara Nacional de Acuicultura .2015. Tendencia de la Producción de camarón en Asia durante el 2014.. Revista Aqua Cultura. edición # 106, pag 28-29.
43. Constitución de la república del Ecuador. Edición 2008.

## **7. ANEXOS**

## ANEXO A

### RESULTADO DEL CONTROL DE CALIDAD UTILIZADO DURANTE EL ANALISIS

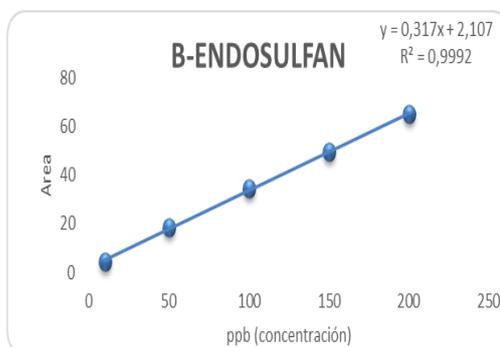
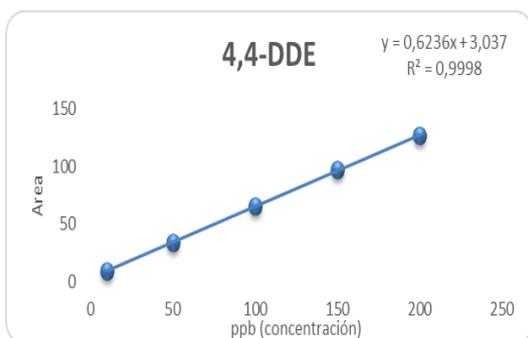
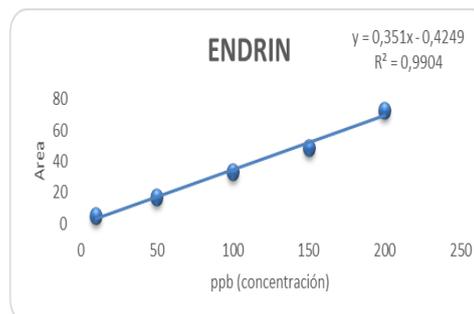
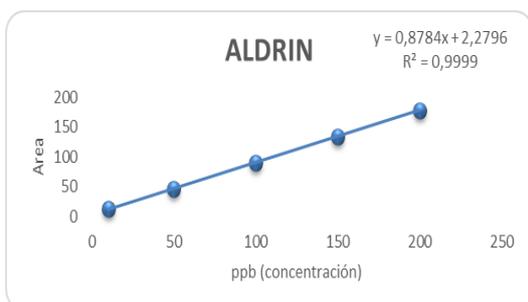
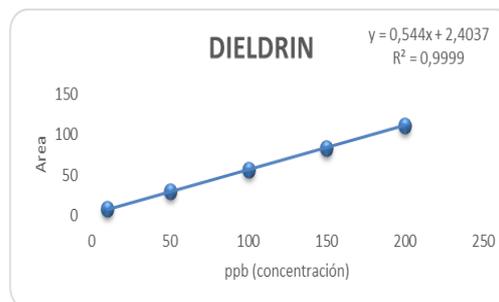
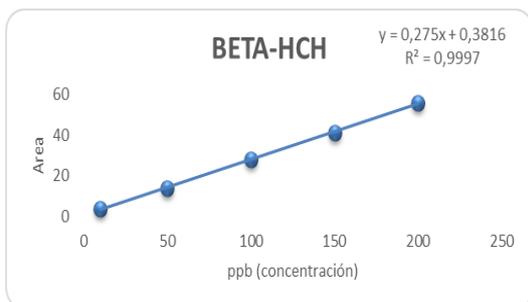
Pesticidas	Concentracion				
	10	50	100	150	200
	Area				
Beta-HCH	3,482	13,715	28,036	41,261	55,683
ALDRIN	11,798	45,213	90,364	133,719	178,287
4,4-DDE	8,978	33,92	65,96	97,441	126,901
DIELDRIN	7,892	29,541	57,157	83,301	111,567
ENDRIN	4,797	17,105	33,186	48,783	73,038
B-ENDOSULFA	4,434	18,474	34,592	49,752	64,965
4,4-DDT	0,882	4,376	12,347	19,389	35,374
Heptacloro	1,084	4,789	9,434	14,547	22,639
METOXICLORO	0,783	4,905	10,383	16,367	24,852



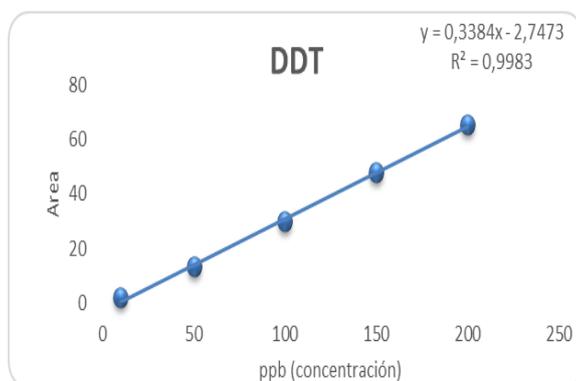
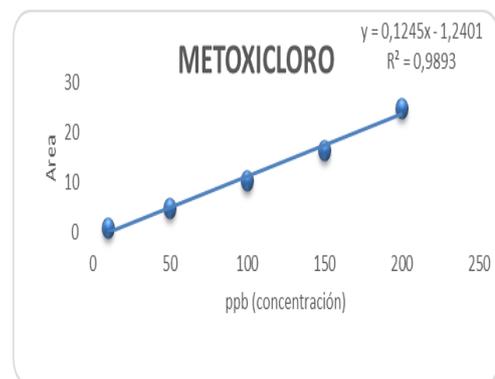
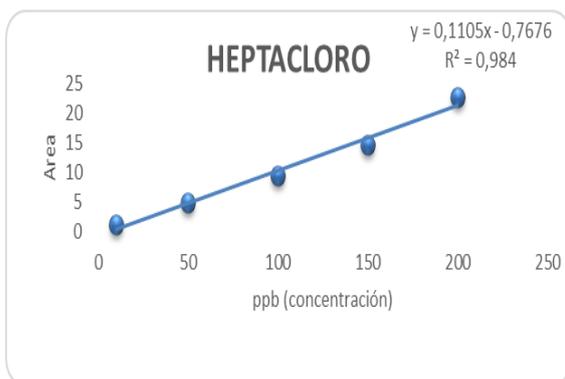
		4,4 DDE						
<b>Analito</b>	P.M (gramos)	<b>Area</b>	<b>curva</b>	<b>resultado(ppb)</b>	<b>% Recup.</b>	<b>valor.asignado</b>	<b>zscore</b>	
4,4-DDE	3,00	39,325	58,1911482	77,59	114	68,3	0.62	
VALOR REFERENCIAL / MUESTRA DE CONTROL DE CALIDAD								
% RECUPERACION	zscore							
70-12%	≤2							
los resultados obtenidos se encuentran dentro de la recuperacion establecida por el material de control con un zscore - 2 lo que indica un resultado satisfatorio .								

## ANEXO B

### CURVAS DE CALIBRACION DE LOS 9 PESTICIDAS ORGANOCORADOS IDENTIFICADOS

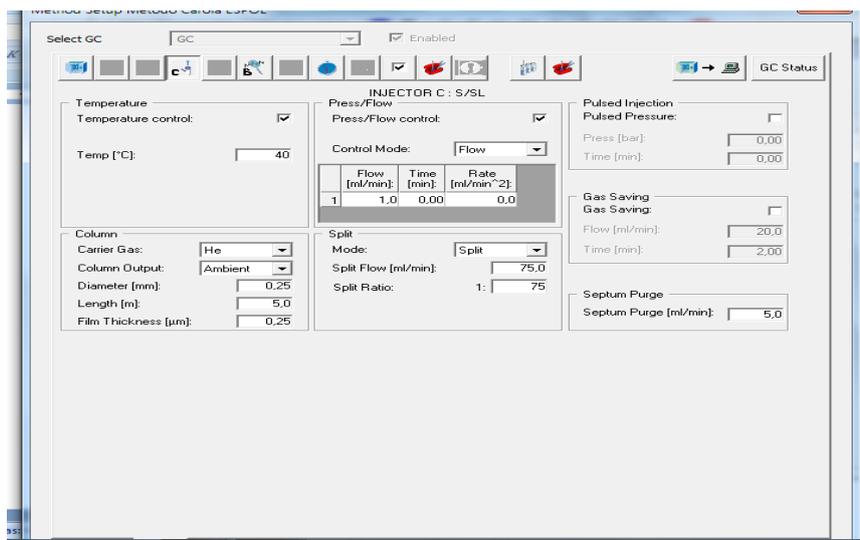


## ANEXO B

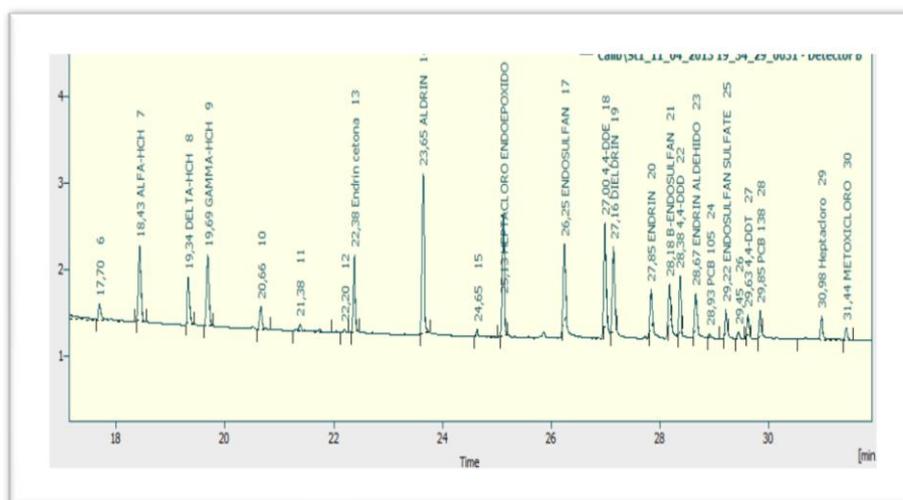


## ANEXO C

### CONDICIONES CROMATOGRAFICAS USADA PARA ACONDICIONAR EL METODO



### ANALISIS MULTRESIDUO ESTÁNDAR MIX DE ORGANOCLORADOS



## ANEXO D

### DIAGRAMA DE FLUJO ANALISIS DE PESTICIDAS ORGANOCOLORADOS EN CAMARÓN

