



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CÁTEDRA TOXICOLOGIA
DR. PABLO PAREDES VIVAS

DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS TIPO ORGANOFOSFORADOS EN VINOS
ARTESANALES EN EL ESTADO MÉRIDA

www.bdigital.ula.ve

Autor:

Manrique P. Gladys J.

C.I. V-19.096.751

Tutor:

Prof. Rincón Jacinto

Mérida, Julio, 2019



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CÁTEDRA TOXICOLOGIA
DR. PABLO PAREDES VIVAS

DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS TIPO ORGANOFOSFORADOS EN VINOS
ARTESANALES EN EL ESTADO MÉRIDA

Tesis de pregrado presentada como requisito para optar al Grado de LICENCIADO EN
BIOANÁLISIS

www.bdigital.ula.ve

Autor:

Manrique P. Gladys J

C.I. V-19.096.751

Tutor:

Prof. Rincón Jacinto

Mérida, Julio, 2019

Dedicatoria

A Dios primeramente, por brindarme salud, vida, ganas, fuerza y amor para continuar con mis sueños, por no borrar en mí nunca la esperanza, por regalarme a la familia más maravillosa y hermosa que alguien pueda tener y la pareja más comprensiva y amorosa, por no dejarme caer en determinadas situaciones y aun en mis caídas me dio la fortaleza para seguir adelante y no rendirme jamás. A mi niño de la cuchilla, por cumplir cada una de mis peticiones, has sido tan bueno y generoso conmigo.

A mis padres, MAMI, promotora de todo lo hoy logrado, gracias mami, estaré eternamente agradecida y hare todo lo humanamente posible para reiterarle todo lo que ha hecho por mí. Es usted una mujer de admirar. PAPI, gracias por tanto. Eres un hombre lleno de muchas virtudes, unas de ellas paciencia, sabiduría y nobleza. Gracias por su confianza hacia a mí, por no juzgar mis pasos, por apoyarme en todo momento y cada uno de sus consejos.

A mi AMOR, gracias por permanecer a mi lado siempre, aún en los malos días, cuando todo se tornaba difícil para mí, siempre había una bonita acción de tu parte y lo hacías todo más fácil para mí, gracias todo Mi amor.

A mi HERMANO, por todo tu apoyo, por creer en mí, por amarme y cuidar siempre de mí. Por crecer unidos y permanecer unidos en las buenas y en las malas.

Agradecimientos

A Dios, por no dejarme desistir, por no perder la fe e impulsarme alcanzar todo lo que deseo de corazón.

A mi Niño de la cuchilla, por cada una de mis peticiones concedidas.

A mis padres, por creer y confiar en mí, por refugiarme en los momentos difíciles y celebrar siempre los buenos momentos.

A mi amor, gracias por ser mi cómplice, mejor amigo, mi amante, mi amor.

A mi hermano, por todo su apoyo, eres un maravilloso hermano, el mejor que pude haber tenido.

A mi profesor Jacinto, gracias por todos estos años de amistad, conocimientos adquiridos, apoyo y consejos. Dios se lo pague.

A mi profesor Carlos, por prestarme toda su colaboración en la parte técnica del Laboratorio de Toxicología. Gracias por su paciencia y generosidad.

Al personal del Área de Toxicología, por cada consejo, conocimiento y apoyo dado.

A la ilustre Universidad de Los Andes, por ser esa casa de conocimientos que permite hacer sueños realidad.

A todos ustedes... Que Dios les Bendiga.

.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO	v
INDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE ESQUEMAS	xi
INDICE DE TABLAS	xii
RESUMEN	xiii
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I. EL PROBLEMA	3
Planteamiento del Problema	4
Justificación de la Investigación	4
Objetivos de la Investigación	6
Objetivo General	6
Objetivos Específicos	6
Alcances y limitaciones de la investigación	7
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	9
Trabajos Previos	9
Antecedentes Históricos	10
Bases Teóricas	11
Plaguicidas	11
Clasificación	12
Características espectrales de pesticida	12
Efectos ocasionados por plaguicidas	13
Riesgos en la salud según la OMS	14
Insecticidas Organofosforados	14
Toxicidad de los organofosfarados	15
Paratión etílico	15

Estructura química del Paratión	16
Importancia del Paratión	16
Como puede afectar la salud el Paratión	17
Pyrinex clorpirifos	17
Estructura química del Pyrinex	18
Como puede afectar la salud	18
Técnicas para determinar organofosforados	19
Pruebas presuntivas de orientación	20
Hidrolisis alcalina	20
Averell norris	20
Cromatografía	21
Cromatografía de capa fina	22
Ventajas de la Cromatografía de capa fina	24
Factores que influyen en la separación por cromatografía	24
Polaridad	24
Elección del eluyente	24
Fundamentos de la Cromatografía de capa fina	25
Proceso de absorción	25
Absorbentes	26
Preparación de la placa cromatografica	26
Aplicación de la muestra	26
Frente del disolvente	26
Elección del solvente	27
Camara para desarrollo	28
Desarrollo de la placa	29
Sistema para cromatografía	29
Evaluación del cromatograma	30
Análisis cualitativo	30
Análisis cuantitativo	30
Revelado cromatografico	31
Medios físicos	31

Medios químicos	31
Determinación del factor de resolución	32
Factores que afectan el factor de resolución	32
Cromatografía de gases	32
Cromatografía Gas-liquido	32
Cromatografía Gas-solido	33
Espectrometría	33
Espectro	33
Espectro electromagnético	33
Radiaciones electromagnéticas	33
Teoría de orbitales moleculares	34
Espectro electrónico	36
Cromóforo	36
Auxócromo	36
Efecto hipsocrómico	36
Efecto batocrómico	36
Disolvente	36
Leyes fundamentales de la Espectroscopia	37
Espectrofotometría	37
Leyes de absorción	37
Ley de Lambert	38
Ley de Beer	38
Ley de Beer-Lambert	38
Desviaciones de la Ley de Beer	39
Absorbancia	39
Espectro de absorción o barrido	39
Curvas de calibración	40
Selección de la longitud de onda	43
Espectroscopia UV-Visible	43
Vinos	45
Tipos de vinos	45

Clasificación general	45
Materia prima	45
Descripción del proceso de producción	46
Proceso para la elaboración del vino	47
Definición operacional de Términos	48
Operacionalización de variables	48
Variable independiente	49
Variable dependiente	50
Hipótesis	51
Hipótesis afirmativa	51
Hipótesis nula	51
CAPÍTULO III: MARCO METODOLOGICO	52
Tipo de investigación	52
Diseño de investigación	52
Población y muestra	53
Unidad de investigación	53
Selección del tamaño Muestral	53
Sistemas de variables	53
Procedimientos de la Investigación	54
Recolección de las muestra de vino artesanales	54
Secado y trasvasado del vino recolectado	54
Preparación de los extractos	54
Determinación de plaguicidas tipo organofosforados	55
Aplicación de pruebas presuntivas de orientación	55
Preparación de los reactivos de Hidrolisis alcalina y Averell norris	56
Determinación de plaguicidas tipo organofosforados	56
Cromatografía de capa fina	56
Preparación de la placa, el tanque y aplicación de la muestra	57
Preparación del revelador	59
Determinación del factor de resolución	59
Espectroscopia UV visible	61

Lecturas de las pruebas	64
Diseño de análisis	65
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
Resultados	67
Discusión	76
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	82
Conclusiones	82
Recomendaciones	83
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	84

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS	Pág.
1. Estructura química general de un organofosforado.	15
2. Estructura química del parathion.	16
3. Estructura química del clorpirifos.	18
4. Reacción química Hidrolisis alcalina.	20
5. Reacción química Averell norris	20
6. Cromatograma en capa fina bidimensional	23
7. Aplicación de la muestra por cromatografía de capa fina (CCF)	27
8. Formación de los orbitales.	34
9. Diagrama de niveles energéticos para diferentes orbitales moleculares y las transiciones posibles en éstos.	35
10. Espectro de absorción.	41
11. Espectrofotómetro de doble haz para lecturas en las regiones UV-visible.	41
12. Aplicación de las muestras.	57
13. Modo de colocación de la placa de Cromatografía en el Tanque de la Fase Móvil.	58
14. Equipo de espectroscopia UV-VIS Shimadzu 1201.	62
15. La presencia de organofosforados en el extracto de la placa de cromatográfica	75
16. La presencia de organofosforados en el extracto en la placa con la lámpara de UV	76
17. Presencia de organofosforados en muestras sospechosas.	79
18. Análisis espectroscópico (UV y UVB visible) de la presencia de organofosforados en muestras sospechosas.	80
19. Presencia de organofosforados en muestras sospechosas de vinos artesanales.	81
20. Presencia de organofosforados en muestras sospechosas de vinos artesanales.	81

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMAS	Pág.
1. Proceso de extracción discontinua y Cromatografía de capa fina.	60
2. Proceso analítico empleado para Espectroscopia UV-VIS.	62
3. Procedimiento para la obtención de los extractos y evaluación de la presencia de organofosforados.	65

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

TABLAS	Pág.
1. Operacionalización de la variable Independiente.	49
2. Operacionalización de la variable Dependiente.	50
3. Resultados obtenidos para la Determinación de organofosforados en vinos artesanales.	67
4. Resultados obtenidos sobre los vinos artesanales con el empleo de la Hidrolisis alcalina y Averell Norris.	70
5. Resultados obtenidos sobre los vinos artesanales con el empleo Cromatografía de capa fina.	71
6. Resultados obtenidos sobre los vinos artesanales con el empleo Espectroscopia UV-VIS.	73

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CÁTEDRA TOXICOLOGIA
DR. PABLO PAREDES VIVAS



**DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS TIPO ORGANOFOSFORADOS EN VINOS
ARTESANALES EN EL ESTADO MÉRIDA**

Tesis de pregrado presentada como requisito para optar al Grado de LICENCIADO EN
BIOANÁLISIS

Autor: Manrique P. Gladys J

Tutor: Prof. Rincón Jacinto

RESUMEN

Los insecticidas organofosforados (IOF) derivan del ácido fosfórico. Los organofosforados se dividen en dos grandes grupos de plaguicidas: los insecticidas y los herbicidas, los cuales poseen un grado de toxicidad para quienes están expuestos o consumen alimentos contaminados con ellos. Por esta razón el objetivo de esta investigación fue Determinar si hay presencia o no de plaguicidas tipo organofosforados en vinos artesanales, en el Laboratorio de Toxicología Dr. Pablo Paredes Vivas de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, durante el periodo de Enero del 2018 hasta octubre del 2018. . La investigación fue de tipo descriptiva, con un diseño de campo. La unidad de investigación fueron las muestras de vinos artesanales. Donde se realizó la obtención de sus extractos con los siguientes solventes: Cloroformo y éter de petróleo. El análisis de la determinación de plaguicidas tipo organofosforados se realizó mediante el método de cromatografía de capa fina y espectroscopia UV-VIS. Resultados: En los extractos totales no se observó la presencia frente a plaguicidas tipo organofosforados.

Palabras claves: Organofosforados, vino, artesanal, extracto, solvente.

INTRODUCCIÓN

Los Plaguicidas son sustancias o mezclas de sustancias de origen natural o sintético, que se destina a prevenir, controlar o destruir cualquier plaga, insectos, roedores que transmiten enfermedades a humanos y animales; y especies botánicas no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción, transporte, almacenamiento y la comercialización de productos agropecuarios y forestales. El amplio uso de plaguicidas en el área Mediterráneo, hace que la exposición a los mismos suponga un evidente riesgo para la salud pública, debido a su demostrada toxicidad. La actividad donde el uso de plaguicidas es mayor es en la agricultura, ya que las cosechas se ven afectadas por una gran diversidad de plagas, así como por la competencia de las malas hierbas. Pero no solamente el sector agrícola se encuentra expuesto a plaguicidas, la población en general también están expuestos a ellos, aunque en distinto grado. Uno de los riesgos para la población general es la exposición a largo plazo provocada por la presencia de residuos de plaguicidas en los alimentos como consecuencia de los tratamientos fitosanitarios, así como por los contaminantes ambientales.

Aunque tienen funciones importantes para prevenir daños a los productos agropecuarios, también muchos de ellos pueden ser contra productores para la salud no sólo para la persona que lo manipula. Un ejemplo de este tipo de plaguicidas son los que contienen organofosforados, los cuales poseen un grado de toxicidad para quienes están expuestos a los alrededores de donde se está realizando la operación **(Del Puerto, et al. (2014))**.

En Venezuela, el estado Mérida siendo un estado eminentemente agrícola no escapa al uso de los agroquímicos. En cuanto a la población que se encuentra en actividades agrícolas, existe una gran variedad de cultivos, que ocupan una posición importante en el empleo de agroquímicos destinados a controlar las plagas en sus plantaciones **(Maldonado, 2012)**.

Atendiendo a la necesidad de controlar y evaluar esta exposición humana, el objetivo principal de la presente investigación consistió en la determinación de plaguicidas tipo organofosforados (OPS) en muestras de vinos artesanales recolectados en el Estado Mérida.

La presente investigación se estructuró en V capítulos. El I denominado El Problema, constituido por el planteamiento del problema, la justificación e importancia de la investigación, el objetivo general y objetivos específicos, así como los alcances y limitaciones de la investigación. El II Capítulo; se mencionan los trabajos previos, antecedentes históricos o epistemológicos, bases teóricas, definición de términos y operacionalización de variables. El III Capítulo titulado Marco Metodológico ordenado con 6 subtítulos, tipo de investigación, diseño de la investigación, población y muestra, sistema de variables, metodología de investigación y diseño de análisis. El IV Capítulo, descrito como resultados y discusión. El V Capítulo titulado conclusiones y recomendaciones.

El objetivo de esta investigación es la Determinar si hay presencia o no de plaguicidas tipo organofosforados en vinos artesanales, en el Laboratorio de Toxicología Dr. Pablo Paredes Vivas de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde Enero del 2018 hasta octubre del 2018.

La metodología usada en esta investigación estuvo representada por la recolección de las muestra de vinos en comercios de venta de bebidas artesanales en el Mercado Principal, ubicado en la Parroquia Antonio Spinetti Dini, municipio Libertador del Estado Mérida, posteriormente donde fueron destinados al proceso de trasvasado, en recipientes previamente esterilizados, y se extrajo con solventes de creciente polaridad para la obtención de los respectivos extractos.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

Desde que el ser humano se hizo agricultor ha estado combatiendo a las plagas que ponen en riesgo sus cosechas, batalla que no cesa, porque dependemos de los productos de la tierra para nuestra supervivencia. El uso de productos químicos es una de las maneras más utilizadas para lograr la protección de los cultivos, lamentablemente este beneficio viene acompañado de efectos negativos sobre el ecosistema y sobre la salud de quienes manejan estos productos, ya que generalmente lo hacen sin tomar las medidas de precaución adecuadas para su manejo, generándose intoxicaciones agudas frecuentes en las zonas de agricultura intensiva (**Repetto, 1997**).

La Organización Mundial de la Salud obliga que en la monitorización de personas expuestas a insecticidas organofosforados y carbamatos se incluya la determinación sanguínea. El amplio uso de plaguicidas en el área Mediterráneo, hace que la exposición a los mismos suponga un evidente riesgo para la salud pública, debido a su demostrada toxicidad (**Pitarch, 2001**).

Es importante señalar que junto con la poda y la fertilización, el control de las plagas y enfermedades de la producción de vinos (vid) constituyen los pilares en los cuales se sustenta una producción vitícola rentable. De nada vale un eficaz combate de las malezas, un esmerado trabajo del suelo, una correcta fertilización o un sistema de poda racional, si se descuida la sanidad de las cepas. La gran superficie de cultivo utilizada por el viñedo y sobre todos las peculiares características climáticas de la zona, han propiciado un hábitat adecuado para el desarrollo de un gran número de plagas, responsables en muchos casos, no solo de la disminución en el rendimiento de una cosecha, sino también de la pérdida total de la misma. Ello obliga, ineludiblemente, al agricultor a utilizar los medios necesarios para la defensa de sus cepas. Frente a los programas de control integrado de plagas que tienden a implantarse, aunque de manera lenta, el agricultor utiliza de forma preferente los productos químicos de manera preventiva, en fechas casi siempre predeterminadas de antemano y no respetando, en muchos casos, los plazos de seguridad establecidos para cada materia activa, lo cual puede

implicar la presencia de residuos de plaguicidas en la vendimia y consecuentemente en el mosto. En Venezuela, específicamente en el Estado Mérida por su gran actividad agrícola, se ha determinado un amplio uso de insecticidas como medida de protección de los cultivos, los cuales causan efectos en la población y en los productos de alimentación expuesto a los mismos, si son manipulados y aplicados sin las medidas de protección pertinentes (**Villa, 2012**).

Todo esto llevo a realizar el siguiente planteamiento del problema de investigación.

¿Existirá la presencia de plaguicidas tipo organofosforados en vinos artesanales recolectados en el Estado Mérida durante el periodo de Enero del 2018 a octubre del 2018?

Justificación de la investigación

Los plaguicidas son sustancias que se utilizan para prevenir, combatir o controlar plagas, enfermedades o malezas. Su uso es frecuente en prácticas agrícolas para evitar pérdidas de cultivos por plagas o para eliminar animales (vectores) que transmiten enfermedades; por lo tanto, debido a la amplia distribución de la producción primaria, la presencia de plaguicidas en suelo se extiende por todo el país (**Flint, 2001**).

La agricultura actual exige un esfuerzo dirigido a estudiar, desarrollar y valorar estrategias que aseguren e incrementen la producción agrícola con objeto de garantizar el suministro de alimentos de calidad a la creciente población mundial. En este sentido, la introducción de productos químicos de uso agrícola como los plaguicidas, ha revolucionado la agricultura hasta tal punto que este tipo de compuestos ha llegado a ser indispensable para producir cultivos en áreas en las que sin el uso de los mismos no sería posible, extender el periodo de desarrollo de las plantas, incrementar su rendimiento y producción así como mantener su calidad y aumentar su periodo de almacenamiento (**Gouveia, 2001**).

Considerando que uno de los temas que más preocupa a la opinión pública, en general, es la presencia de residuos de estas sustancias en alimentos tratados, sobretodo frutas y hortalizas, puesto que incide directamente en la seguridad alimentaria (**Ica, 1995**).

Los plaguicidas tienen efectos agudos y crónicos en la salud; se entiende por agudos aquellas intoxicaciones vinculadas a una exposición de corto tiempo con efectos sistémicos

o localizados, y por crónicos aquellas manifestaciones o patologías vinculadas a la exposición a bajas dosis por largo tiempo.

Un plaguicida dado tendrá un efecto negativo sobre la salud humana cuando el grado de exposición supere los niveles considerados seguros. Puede darse una *exposición directa* a plaguicidas (en el caso de los trabajadores de la industria que fabrican plaguicidas y los operarios, en particular, agricultores, que los aplican), o una *exposición indirecta* (en el caso de consumidores, residentes y transeúntes), en particular durante o después de la aplicación de plaguicidas en agricultura, jardinería o terrenos deportivos, o por el mantenimiento de edificios públicos, la lucha contra las malas hierbas en los bordes de carreteras y vías férreas, y otras actividades **(Puerto, 2014)**.

El presente estudio se basa en la búsqueda de definiciones, comparaciones, análisis, de varios tipos y marcas de vinos artesanales con la finalidad de determinar la presencia de plaguicidas tipo organofosforados, en este tipo de producto recolectado en el estado Mérida. La importancia de este aporte como estudio científico, se justifica, en si existe o no la presencia de químicos organofosforados, en los vinos artesanales.

Con la presente investigación se contribuirá a generar importantes avances en el tema de la agricultura, del cuidado del medio ambiente, de la preservación de la vida, ante la no utilización de organofosforados en los cultivos de diversas frutas para la recolección de vinos artesanales. La investigación resulta de gran importancia ya que los estudios anteriores han demostrado que si existen este tipo de químico de organofosforado en la industria de los vinos.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Determinar la presencia de plaguicidas tipo organofosforados en vinos artesanales recolectados en el estado Mérida, mediante la optimización de un método basado en el uso de las técnicas de Cromatografía de capa fina y Espectroscopia UV visible en el Laboratorio de Toxicología Dr. Pablo Paredes Vivas de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, en Enero del 2018 hasta octubre del 2018.

Objetivos Específicos

- Evaluar la presencia de plaguicidas tipo organofosforados en vinos artesanales recolectados en el Estado Mérida mediante el uso de pruebas presuntivas de orientación como la Hidrolisis alcalina y Averrell Norris visible en el Laboratorio de Toxicología Dr. Pablo Paredes Vivas de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, en Enero del 2018 hasta octubre del 2018.
- Evaluar la presencia de plaguicidas tipo organofosforados frente a vinos artesanales recolectados en el Estado Mérida mediante la técnica de cromatografía de capa fina y espectroscopia UV-VIS visible en el Laboratorio de Toxicología Dr. Pablo Paredes Vivas de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, en Enero del 2018 hasta octubre del 2018.
- Determinar los distintos factores de contaminación por plaguicidas organofosforados en diferentes materias primas, uvas, fresas, otros, en la elaboración de vinos artesanales.

Alcances y limitaciones de la Investigación

Hernández, Fernández y Batista explican (2010) “cuando se habla sobre el alcance de una investigación, no se debe pensar en una tipología, ya que más que una clasificación, lo único que indica dicho alcance, es el resultado que se espera obtener del estudio”. Según estos autores se pueden obtener cuatro tipos de resultados en una investigación 1) estudio exploratorio: información general sobre un fenómeno o problema poco conocido. 2) estudio descriptivo: información detallada sobre un fenómeno o problema para describir sus dimensiones (variables) con precisión. 3) estudio correlacional: información actual respecto a la relación entre dos o más variables. 4) estudio explicativo: causa de los eventos, sucesos o fenómenos estudiados. El alcance de la presente investigación, permitirá comprobar mediante un estudio descriptivo los resultados negativos en las muestras, determinando no presencia de elementos tóxicos organofosforados en los vinos artesanales, en el Laboratorio de Toxicología Dr. Pablo Paredes Vivas.

Limitaciones de la Investigación

La limitación mas incidente en mi investigación fue el deterioro sin posible reparación de equipos analíticos como el “Cromatografo de Gases Acoplado a masas” (GCMS), que para el momento del estudio se encontraba dañado y para la reparación de los mismos tienen muy altos costos que por la situación económica del país la institución no puede ser arreglada, continuando sin uso para el acceso de los estudiantes en estas oportunidades.

La dificultad para conseguir reactivos, la situación país afecto determinantemente este estudio en sus inicios como consecuencia del tema económico, ni su existencia dentro de los laboratorios de la facultad, no encontrando algunos de los reactivos más importantes, sin embargo se pudieron localizar a través del comercio local a precios elevados.

Otra de las limitaciones iniciales dentro de la presente investigación, ocurrieron durante la recolección de las muestras en estudio, debido a la falta de recursos económicos para cubrir

gastos propios de logística, traslado hacia los diferentes lugares, entre otras necesidades logísticas que no permitieron satisfacer ciertas necesidades dentro del proceso productivo.

Entre otras limitaciones muy recurrentes en estos momentos de la situación país, esta la falla permanente de la electricidad en todos los espacios y lugares donde me encontrara desarrollando mi investigación, afectando en un porcentaje la celeridad de la misma.

De la misma manera la situación país en el tema de todos los servicios básicos afectaron mi investigación, tales como la falta de gas, la falta de agua, el tema de la gasolina, siempre hubo alguna justificación que se refiriera directamente a algunos de los servicios mencionados lo que imposibilitaba la realización de tareas puntuales.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO II

MARCO TEORICO

Trabajos previos

La presencia de residuos de plaguicidas en los vinos depende de diversos factores, tantos como el número de etapas que constituyan el proceso de producción y puede traer consigo consecuencias toxicológicas y problemas que supongan un detrimento de su calidad. De hecho, algunos autores han observado la calidad aromática del vino puede verse modificado por la presencia de residuos de plaguicidas durante el proceso de fermentación (**Ravelo, 2009**).

Una de las principales causas podría estar asociada a que, comparada con otras técnicas como cromatografía de gases (GC) o Cromatógrafo de líquidos de alta resolución” (HPLC), la electroforesis capilar (CE) presenta una menor sensibilidad, aunque este inconveniente se ha solventado haciendo uso de diferentes estrategias pre concentración, tanto en línea como fuera de línea. Entre ellas, la microextracción en fase sólida (SPME) ha resultado ser un procedimiento interesante para la extracción y pre concentración de plaguicidas de distintas muestras, especialmente muestras complejas. Sin embargo, hasta el momento en muy pocos trabajos se ha utilizado la SPME como etapa previa a la determinación de plaguicidas por CE (**Molina-Mayo, 2007**).

En los demás países, entre ellos España, se han considerado (aunque sin indicación expresa por parte de las autoridades) como límites indicativos los límites máximos de residuos LMRs establecidos para uvas de vinificación. Generalmente, el análisis de residuos de plaguicidas en vino se ha llevado a cabo por GC y HPLC. En lo que respecta a la CE, a pesar de que esta técnica complementa y, en algunos casos, sustituye a los métodos cromatográficos, prácticamente no se ha empleado en la determinación de plaguicidas en muestras de vino. De hecho, únicamente existe un trabajo en la literatura sobre el análisis de un reducido grupo de plaguicidas en vinos blancos por CE (**Nozal, 2005**).

Antecedentes Históricos

La historia de los plaguicidas en tres etapas claramente diferenciadas. En una primera etapa, a inicios del siglo XIX, se descubrió accidentalmente la acción plaguicida de elementos naturales como el azufre, el cobre, el arsénico, el fósforo, etc. Todas estas sustancias forman el grupo de los llamados insecticidas de primera generación. Hoy día se utilizan muy poco y bastantes de ellos están incluso prohibidos por su excesiva toxicidad. Caso aparte lo constituyen las flores de pelitre, utilizadas secas y pulverizadas como insecticidas para matar garrapatas y otros insectos como pulgas y mosquitos. El uso de estas flores comenzó en Persia, de donde pasó al Cáucaso, introduciéndose en Europa a principios del siglo XIX. Actualmente, a partir de ellas se obtiene un insecticida conocido como piretrina, que se degrada rápidamente en el ambiente, especialmente al exponerse a la luz solar. También en esta época se utilizó por primera vez el caldo bordelés (sulfato cúprico, cal y agua) como fungicida, con objeto de eliminar el moho de la producción vitícola **(David, 1988)**.

La segunda etapa comienza a partir de la Primera Guerra Mundial, en la que se prohibió la importación a Alemania de nitrato amónico y otros abonos nitrogenados procedentes de Chile (principal productor mundial) que podían utilizarse en la fabricación de explosivos. Como consecuencia, Alemania construyó importantes plantas industriales y amplió la capacidad de producción de amoníaco, mediante el proceso Haber-Bosch, a unas 120.000 toneladas de amoníaco sintético anuales. Una vez finalizada la guerra, la agricultura fue el mejor mercado para la industria química, que introdujo los denominados plaguicidas de síntesis. Estos avances de la ciencia y de la industria química hicieron posible la aparición de plaguicidas mejores que los naturales, concretamente los insecticidas denominados de segunda generación. La familia de plaguicidas más importante de esta época fue la de los organoclorados **(David, 1988)**.

La tercera etapa de la historia de los plaguicidas abarca el período comprendido entre la Segunda Guerra Mundial y la actualidad. Muchos de los utilizados habían sido sintetizados durante la guerra como armas químicas. A modo de ejemplo, durante esta época se crearon

los denominados gases de guerra, a menudo conocidos bajo el apelativo de “gases nerviosos”, derivados del ácido fosfórico y concebido para matar masivamente. Estos compuestos se conocen hoy en día como insecticidas organofosforados y fueron el motivo de que ya en 1959 se hubieran sintetizado alrededor de 50.000, al revelarse como útiles elementos de lucha contra las plagas de insectos. También el diclorodifeniltricloroetano 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano (DDT), utilizado para matar insectos, surgió durante la guerra. Fue Müller en 1940 quien descubrió las propiedades insecticidas de este compuesto organoclorado, el cual fue utilizado para la eliminación del piojo humano que transmitía enfermedades como el tifus. A partir de 1977 fue prohibido su uso por su alta persistencia, su capacidad de acumulación en tejidos grasos y su alta toxicidad, aunque todavía hoy se encuentran restos de DDT en muestras de diversa índole. Después del descubrimiento de la acción insecticida del DDT en Suiza, se descubría simultáneamente en Francia y en el Reino Unido la del HCH (hexaclorociclohexano). Posteriormente, con la ayuda de los estudios científicos sobre plantas e insectos, se marca una nueva etapa en el desarrollo de nuevos fungicidas, herbicidas e insecticidas. Uno de los grupos más importantes es, probablemente, el de los piretroides o piretrinas sintéticos.

Actualmente, se utilizan centenares de plaguicidas de diferente naturaleza química mayoritariamente en agricultura, para eliminar malas hierbas, plagas y hongos de los cultivos, aunque también presentan aplicaciones no agrícolas, como el control de malas hierbas en vías de ferrocarril, carreteras, caminos y áreas industriales (David, 1988).

Bases Teóricas

1.- Plaguicidas

Los plaguicidas son sustancias que se utilizan para prevenir, combatir o controlar plagas, enfermedades o malezas. Su uso es frecuente en prácticas agrícolas para evitar pérdidas de cultivos por plagas o para eliminar animales (vectores) que transmiten enfermedades (Lilia, 1997)

1.2.- Clasificación:

Los plaguicidas se pueden clasificar según:

- **Según el tipo de organismo que se desea controlar:** insecticidas, acaricidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas, molusquicidas, rodenticidas, avicidas.
- **Según grupo químico del principio activo:** compuestos organofosforados, compuestos carbamatos, compuestos organoclorados, piretroides, derivados del bupiridilo, triazinas, tiocarbamatos, derivados del ácido fenoxiacético, derivados de la cumarina, derivados del cloronitrofenol, compuestos organomercuriales, entre otros.
- **Según su persistencia al medio ambiente:** Persistentes, poco persistentes, no persistentes.
- **Según su toxicidad aguda (O.M.S.):** Esta se basa principalmente en la toxicidad por vía oral en ratas y ratones. Usualmente la dosis se registra como el valor DL50 (Dosis Letal Media) que es la dosis requerida para matar al 50% de la población de animales de prueba y se expresa en términos de mg/kg del peso del cuerpo del animal (**CONAPMAS, 1989; Henao, 1991**)

Actualmente, los más expedidos en las zonas agrícolas merideñas son los plaguicidas organofosforados y carbamatos (**CONAPMAS, 1989**)

1.3.- Características espectrales de pesticidas

Los plaguicidas pueden ser clasificados por diversas características, entre ellas, es por su composición química. Bajo esta categoría se dividen en: organoclorados, organofosforados, piretroides y carbamatos (insecticidas); dinitrofenoles y triazinas (herbicidas); fenoles y compuestos de cobre y azufre (funguicidas) (**CICOPLAFEST, 2000**) los cuales comparten distintas características por grupo como por ejemplo la toxicidad (**Hesse, 2012**).

Los organoclorados son compuestos orgánicos formados por enlaces entre carbono, cloro e hidrogeno. El primer organoclorado sintetizado fue el diclorodifeniltricloroetano (DDT), el cual resultaba un método eficaz para combatir plagas, sobre todo al mosquito transmisor de la malaria. Su uso continuo hasta que en 1973 la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) prohíbe el uso del DDT por ser una sustancia nociva para la salud. Otros organoclorados son los relativos al benceno, como el hexaclorobenceno; los clorofenoles, dioxinas, bifenilos policlorados y los ciclodienos (**Hesse, 2012**).

Los organofosforados son compuestos sintéticos cuya estructura está formada por átomos de carbono, oxígeno y fósforo o en algunos casos, con plomos de azufre. Su estructura también puede estar compuestas por radicales alquilo, generalmente metilo o etilo, y por un radical arilo. Se caracterizan por su rápida degradación, y su toxicidad dependerá de cada compuesto en específico (**Hesse, 2012**).

Los organofosforados se pueden dividir en 14 grupos, siendo los más importantes los fosfatos, los O-fosfortiotas (o tionatos), S-fosfortioatos (o tiolatos), los fosforoditioatos (o tiolotionatos), los fosfonatos y los fosforoamidatos, cuyas diferencias están determinadas por los elementos y su localización en la estructura molecular (Hesse, 2012).

Con respecto a las características espectrales de pesticidas organofosforados resulta importante considerar que algunas características de absorción se localizan en regiones del UV, como por ejemplo en los S-fosfortioatos que se presenta a los 0.21 μm . Sin embargo, los grupos de metilo tienen sus características de absorción en el infrarrojo cercano, en las bandas de 0.912 a 0.915 μm , de 1.216 a 1.220 μm . y de 1.824 a 1.830 μm (Jaglarz, 2006).

1.4.- Efectos ocasionados por plaguicidas

Los plaguicidas son compuestos que han favorecido al desarrollo industrial como agrícola, sin embargo los efectos que producen tanto a la sociedad como en el medio ambiente están ocasionando que se genere la búsqueda de alternativas de menor o nulo impacto (**Reséndez, 2009**).

En el caso de los plaguicidas, es necesario considerar que los efectos más comunes en los ecosistemas incluyen: a) la resistencia que a su acción muestran cientos de especies de insectos, hongos y malezas, con clara tendencia a aumentar en el futuro, b) las variaciones

en el éxito reproductor de una gran variedad de plantas, inducidas por los efectos nocivos de los plaguicidas sobre los organismos polinizantes, c) la reducción de las poblaciones vegetales y animales benéficas, d) la presencia de plaguicidas persistentes en el agua, el suelo y los organismos vivientes (**Saval, 2012**).

Además, se debe considerar que algunos plaguicidas pueden permanecer en las personas que laboran en el riego de las sustancias, o pueden existir otros medios de transferencia como los productos alimenticios o a través del agua y aire por el cual se puede tener contacto con ellas. Algunos estudios han encontrado un aumento de la tasa de ciertos cánceres en gente que está expuesta frecuentemente a pesticidas, como por ejemplo agricultores y aplicadores profesionales (ATSDR, 2003). También se han vinculado los efectos de los plaguicidas al nivel de morbilidad oncológica (cáncer), pulmonar y hematológica, así como a las deformidades congénitas... y deficiencias del sistema inmunitario (**Icen, 2005; Ortinez, 2003**).

1.5.- Riesgos en la salud según la OMS.

La aplicación de plaguicidas y el abuso de antibióticos son los principales promotores de cambios genéticos de origen antropogénico, que inducen resistencia a los plaguicidas en insectos que son vectores de enfermedades y desencadenan la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos. Además, la contaminación ambiental por falta de saneamiento, mientras que los contaminantes químicos como nutrientes y fertilizantes depositados en las zonas costeras se han relacionado con un aumento de la proliferación de algas tóxicas, que una causa importante de intoxicaciones alimentarias (**Organización Mundial de la Salud, 2018**).

2.- Insecticidas Organofosforados

Los Insecticidas Organofosforados (IOF) son un grupo de productos químicos formados por ésteres del ácido tiofosfórico. Los organofosforados se dividen en dos grandes grupos de

plaguicidas: los insecticidas y los herbicidas, los cuales son estructuralmente diferentes, siendo usualmente utilizados los insecticidas (**Fernández, et al., 2010**).

Los organofosforados tienen gran variabilidad en su estructura (Figura 1) dependiendo principalmente de los sustituyentes en R1, R2 y X, donde la gran toxicidad está asociada con los compuestos del grupo X, ya que es un grupo de agentes altamente electronegativos como un halógeno, el cianuro o el tiocianato.

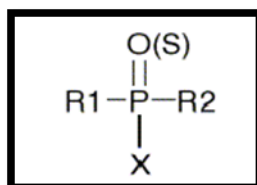


Figura 1. Estructura química general de un organofosforado. Imagen tomada de Calabuig. (Calabuig, 2004).

Toxicidad de los organofosforados:

- **Categoría I (DL50: 0-50mg/kg)**
 - ✓ Dicrotofós
 - ✓ Parathion etílico
 - ✓ Monocrotofos

- **Categoría II (DL50: 50-500mg/kg)**
 - ✓ Fenthión
 - ✓ Parathión metílico
 - ✓ Ethión
 - ✓ Clorpirifos

- **Categoría III (DL50: mas de 500mg/kg)**
 - ✓ Mercaptothión
 - ✓ Malathión (**Icen, 2005**).

2.1.- Qué es el Parathión etílico

El parathión (nombre químico O,O-Dietil-O-4-nitro-feniltiofosfato) es un plaguicida organofosforado prohibido en todas sus formulaciones y usos por ser dañino para la salud humana; animal y el ambiente.

Es un potentísimo insecticida y acaricida extremadamente tóxico, con pobre poder residual. Fue originalmente desarrollado por *IG Farbenindustrie AG* (versión corta de *Interessen-Gemeinschaft Farbenindustrie AG*, "grupo de empresas de la industria colorante", también llamado *I.G. Farbenfabriken*) en los 1940. Es altísimamente tóxico para todos los organismos de vida, incluyendo humanos. En algunos países solo está restringido su uso, y hay propuestas para prohibirlo en todos sus usos; está estrechamente relacionado con el "metil parathión" (**Reseña Toxicológica del Parathión, 2017**).

2.1.2.-Estructura química del Parathión etílico

En forma pura, parathión es un líquido amarillo pálido con leve olor a fenol. La preparación de calidad técnica es un líquido amarillo pálido a pardo oscuro.

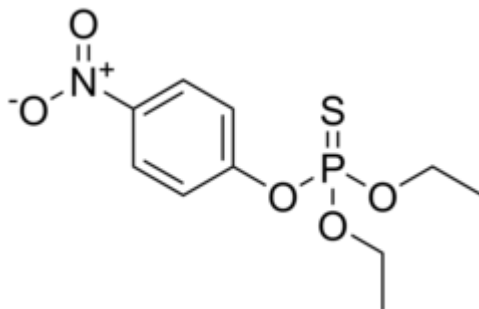


Figura 2. Estructura química del parathion. Imagen fue extraída de la Reseña Toxicológica del Parathión del 2017 producida por la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, Servicio de Salud Pública, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública en Atlanta, GA.

2.1.3.- Importancia del Parathión

El parathión es un pesticida organofosforado que ya no se usa o produce en los Estados Unidos. Por lo tanto, es improbable que la población general se exponga a esta sustancia. El parathión afecta la función del sistema nervioso y la exposición a niveles altos puede causar la muerte. El parathión se ha encontrado en por lo menos 210 de los 1,832 sitios de la Lista de Prioridades Nacionales identificados por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) (**Reseña Toxicológica del Parathión, 2017**).

2.1.4- Cómo puede afectar la salud el parathión

El parathión afecta principalmente al sistema nervioso. Las personas que ingirieron parathión intencionalmente o en alimentos contaminados, que se expusieron durante la aplicación del pesticida en terrenos, o que entraron demasiado pronto a áreas que habían sido rociadas con parathión sufrieron secreción excesiva de saliva y lágrimas, visión borrosa, calambres estomacales, diarrea, dificultad para respirar, temblores, convulsiones, y algunos murieron.

Estudios de trabajadores agrícolas sugieren que la exposición prolongada (años) a cantidades bajas a moderadas de parathión puede estar asociada con asma alérgica, pérdida de la audición, alteraciones de la glándula tiroides, depresión y diabetes. Un estudio de trabajadores hombres en China sugirió que el parathión podría estar asociado con bajo número de espermatozoides. En todos estos casos, las asociaciones fueron débiles y los sujetos pueden haber estado expuestos a otras sustancias químicas al mismo tiempo (**Reseña Toxicológica del Parathión, 2017**)

2.2.- Qué es Pynex clorpirifos

Clorpirifos (nombre de la IUPAC: O, O-dietil O-3,5,6-trichloropyridin-2-il fosforotioato) es un insecticida (se utiliza para controlar las plagas de insectos) organofosforado cristalino que inhibe la acetilcolinesterasa causando envenenamiento por colapso del sistema nervioso del insecto. Se le conoce por muchos nombres comerciales. El clorpirifos es moderadamente

tóxico y la exposición crónica se ha relacionado con efectos neurológicos, trastornos del desarrollo y trastornos autoinmunes.

No es muy soluble en agua, de manera que generalmente se mezcla con líquidos aceitosos antes de aplicarse a cosechas o a animales. También se puede aplicar a cosechas en forma de cápsulas (Quitoquímica, 2009).

2.2.1.-Estructura química del clorpirifos

El clorpirifos es un insecticida sólido blanco de apariencia cristalina y de aroma fuerte. No es muy soluble en agua, de manera que generalmente se mezcla con líquidos aceitosos antes de aplicarse a cosechas o a animales. También se puede aplicar a cosechas en forma de cápsulas.

El clorpirifos se ha usado ampliamente en viviendas y en agricultura. En el hogar, se usa para controlar cucarachas, pulgas, y termitas; también se usa en ciertos collares de animales domésticos para controlar pulgas y garrapatas. En agricultura, se usa para controlar garrapatas en ganado y en forma de rocío para el control de plagas de cosechas.

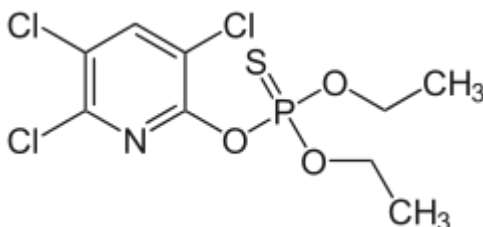


Figura 3. Estructura química del clorpirifos. Imagen tomada de la empresa de Quitoquímica del 2009 “biotecnológica que está en la constante búsqueda y desarrollo de nuevos productos e insumos 100% ecológicos, de origen natural y biodegradable”.

2.2.2.- Como puede afectar la salud

Los científicos utilizan muchas pruebas de laboratorio para proteger al público contra los efectos perjudiciales de las sustancias químicas tóxicas y para encontrar formas de tratamiento para las personas que han sido afectadas.

Una manera de saber si una sustancia química puede afectar a una persona es determinando cómo el cuerpo la absorbe, la utiliza y la libera. En el caso de ciertas sustancias, puede ser necesario hacer pruebas en animales. Las pruebas en animales pueden servir también para identificar efectos adversos a la salud tales como el cáncer y los defectos congénitos. Sin las pruebas en animales, los científicos perderían un método básico para obtener la información necesaria para tomar decisiones acertadas que protejan la salud pública. Los científicos tienen la responsabilidad de tratar los animales que usan en las investigaciones con cuidado y compasión. Las leyes actuales protegen el bienestar de estos animales y los científicos deben cumplir con reglas muy estrictas para el cuidado de estos animales.

En las personas, la exposición por poco tiempo (un día) a niveles bajos (miligramos) de clorpirifos puede causar mareos, fatiga, secreción nasal, lagrimeo, salivación, náusea, molestia intestinal, sudor y cambios en el ritmo cardíaco. La exposición oral de corta duración a niveles más altos (gramos) de clorpirifos puede causar parálisis, convulsiones, desmayos y muerte. Los informes también muestran que la exposición al clorpirifos por poco tiempo puede causar debilidad muscular en las personas, semanas después de la desaparición de los síntomas originales. Otras consecuencias de la exposición al clorpirifos abarcan cambios de conducta o hábitos de sueños, cambios de humor y efectos en el sistema nervioso y en los músculos de las extremidades (que pueden manifestarse a través de sensaciones extrañas como insensibilidad u hormigueo o como debilidad muscular). La EPA (Agencia de Protección del Medio Ambiente de EE. UU); no ha clasificado el clorpirifos por su carcinogenicidad (Clase D) **(Quitoquímica, 2009)**.

3.0.- TÉCNICAS PARA LA DETERMINACION DE PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN VINOS ARTESANALES.

Para la evaluación y valoración de la determinación de plaguicidas, una sustancia de origen sintético u químicos, se utilizan diversos métodos, los cuales se rigen de acuerdo a las técnicas de ensayo: Hidrolisis alcalina, Averell Norris, Cromatografía de capa fina, y Espectrofotómetro UV:

3.1.- Pruebas presuntivas de orientación

- **3.1.2.- Hidrolisis alcalina:** se fundamenta en la reacción que se basa en la hidrólisis en medio alcalino dando p-nitro fenol de color amarillo. Esta reacción es positiva con compuestos que generan este metabolito.

Reacción química:

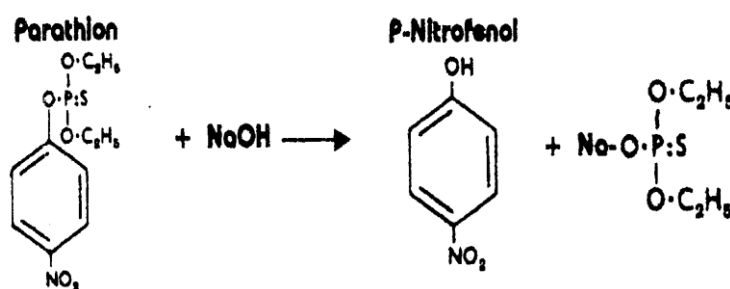


Figura 4. Reacción química Hidrolisis alcalina. Tomado de la guía de Laboratorio de Toxicología General de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes. (Barrios, 2018)

- **3.1.3.- Averell norris:** se fundamenta en la reducción del grupo nitro se logra con HCl y Zn en polvo y la amina resultante se diazoza y se acopla con el clorhidrato de N-1-naftil etilendiamina. La reacción usada es la prueba de identificación para aminas aromáticas, partiendo de un nitrocompuesto aromático.

Reacción química:

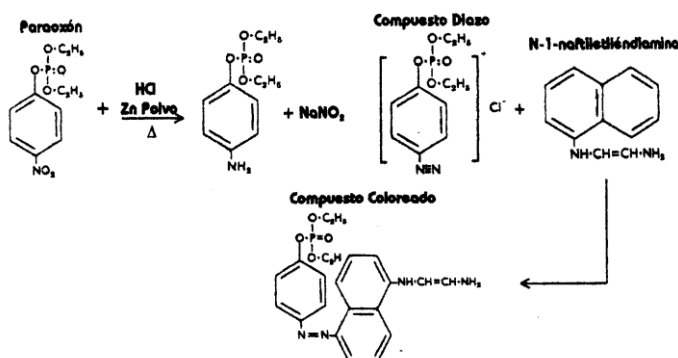


Figura 5. Reacción química Averell norris. Tomado de la guía de Laboratorio de Toxicología General de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes. **(Barrios, 2018)**

3.2.- CROMATOGRAFÍA

La cromatografía se define como la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra una fase móvil. Varios tipos de cromatografía son posibles, dependiendo de la naturaleza de las dos fases involucradas: sólido-Líquido (capa fina, papel o columna), Líquido-Líquido y gases-líquido (fase vapor).

Todas las técnicas cromatográficas dependen de la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases inmiscibles: una fase móvil, llamada también activa, que transporta las sustancias que se separan y que progresa en relación con la otra, denominada fase estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas y la estacionaria puede ser un sólido o un líquido **(Abbott, 1970)**

Las cromatografías se pueden separar en:

- Cromatografía plana.
- Cromatografía en columna.

3.2.1.- Cromatografía plana

La fase estacionaria se fija sobre una placa plana o a los intersticios de un papel; en este caso la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad o por gravedad **(Rouessac y Rouessac, 2003)**. Se emplea una capa horizontal y relativamente delgada de un material que es a la vez soporte, o que se coloca sobre una superficie de vidrio, plástico o metálica.

La ventaja principal de la cromatografía plana es que la muestra y el patrón se analizan simultáneamente. Además cuando se tienen muestras difíciles de separar se puede resolver

utilizando dos disolventes diferentes por desarrollo de la placa en direcciones perpendiculares. Como en la cromatografía plana la placa sólo se usa una vez, se pueden utilizar condiciones severas de separación que si se usasen en cromatografía en columna podrían dañar el relleno y destruir rápidamente la columna.

Las principales técnicas son:

- Cromatografía en papel. Es un proceso muy utilizado en bioquímica, donde el absorbente lo constituye un papel de filtro. Una vez corrido el disolvente se retira el papel y se deja secar, se trata con un reactivo químico con el fin de poder revelar las manchas.

Cromatografía en capa fina. Es una técnica complementaria de la HPLC que tiene su propia especificidad. La separación de los constituyentes de la muestra por cromatografía en capa fina se realiza sobre una delgada capa (100-200 μm) del material que constituye la fase estacionaria, generalmente compuesta por gel de sílice, depositado sobre una capa rectangular de vidrio, plástico o aluminio. El principio de la separación entre las fases es semejante al de la HPLC, pero el proceso experimental es diferente (**Rouessac y Rouessac, 2003**).

3.3.- Cromatografía de capa fina

Es una técnica muy utilizada para la identificación y determinación de pureza de compuestos, también puede utilizarse como técnica de separación (cromatografía de capa fina TLC preparativa) a muy pequeña escala.

En esta técnica la fase estacionaria es una capa fina de gel de sílice u otro soporte con propiedades adsorbentes dispuesta sobre un soporte de vidrio o aluminio que denominaremos placa. El eluyente o fase móvil será la mezcla de disolventes adecuada.

La cromatografía de capa fina es un procedimiento que se utiliza para separar moléculas relativamente pequeñas. La separación de mezclas de moléculas mediante la cromatografía de capa fina se basa en el principio del reparto entre dos fases. Al igual que otras cromatografías, consiste de una fase estacionaria y una fase móvil y el principio es el mismo: la sustancia de

interés se adherirá a la fase estacionaria o se moverá con la fase móvil, viajando una distancia que es inversamente proporcional a la afinidad por la fase estacionaria. La fase estacionaria puede ser variada. Puede ser de papel, de celulosa o de un gel de silicato (vidrio molido bien fino) unido a una superficie sólida (una placa de vidrio, aluminio, plástico o papel). Esta superficie sólida puede ser rígida o flexible. El tipo de fase estacionaria que se utilice en un experimento dependerá del tipo de moléculas que se quieran separar. Incluso vienen algunas placas con indicadores fluorescentes.

La fase estacionaria consiste de un solvente que puede ser agua, un solvente orgánico o una mezcla de ambos.

El procedimiento es sencillo: Se colocan las muestras a un centímetro del borde en uno de los extremos de la placa, se deja secar, se coloca la placa en un envase (tanque de desarrollo) que ya contiene una pequeña cantidad del solvente, se tapa y se deja correr por un rato. El solvente subirá por capilaridad e irá arrastrando las moléculas, las cuales se moverán según la afinidad que muestren por la fase estacionaria. Si la mezcla de muestras que se está analizando presenta color, se verán los distintos colores migrando a distintas velocidades. Si son incoloras hay que someter la placa a algún tratamiento con una sustancia desarrolladora para poder determinar la presencia de sustancias sobre el silicato. El tipo de desarrollador dependerá del tipo de moléculas que se analizan (Casaverde, 2014).

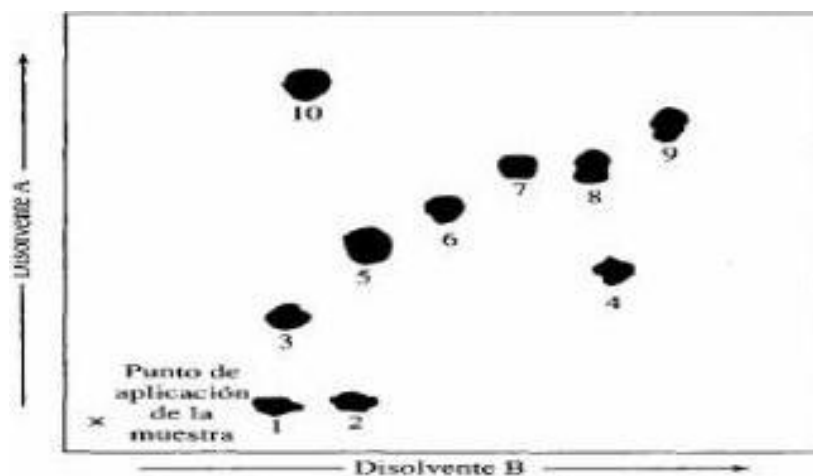


Figura 6

Figura 1.- Cromatograma en capa fina bidimensional (gel de sílice) de algunos aminoácidos. Disolvente A: tolueno/2- cloroetano/piridina. Disolvente B: cloroformo/alcohol bencilico/ácido acético. Aminoácidos: (1) ácido aspártico, (2) ácido glutámico, (3) serina, (4) f3-alanina, (5) glicina, (6) alanina, (7) metionina, (8) valina, (9) isoleucina y (10) cisteína.

Entre las ventajas de la Cromatografía de capa fina (TLC) están:

- Habilidad para detectar múltiples drogas presentes en la muestra.
 - Separación rápida permitiendo obtener resultados en menor tiempo.
 - Las Marchas son discretas y compuestas
 - Uso de reactivos detectores corrosivos sin ocasionarle daño al sustrato o al absorbente.
 - Capacidad para detectar sustancias con concentraciones 10 veces menores a los detectables por otros métodos.
 - Método de elección para separar lípidos de PM cercanos.
 - Fácil uso. (Yáñez, 2008)

3.3.1.- Factores que influyen en la separación por cromatografía:

Polaridad

La mayor o menor velocidad de desplazamiento a lo largo de la columna depende directamente de la estructura de cada molécula así como de los grupos funcionales que pueda poseer. El motivo principal es su diferente polaridad. Moléculas más polares quedan más retenidas en la fase estacionaria, es decir "corren menos", mientras que las moléculas menos polares se ven menos retenidas y avanzan a mayor velocidad arrastradas por eluyente (Casaverde, 2014).

Elección del eluyente

La polaridad de la mezcla de disolventes - eluyente - utilizado es clave para obtener una buena separación.

Eluyentes más polares arrastran más fácilmente a los compuestos, es decir los compuestos "corren más" en eluyentes más polares. Por el contrario, mezclas de disolventes con poca polaridad desplazan los compuestos a través de la columna con mayor lentitud.

La polaridad relativa de los disolventes más usuales se encuentra relacionada en una tabla denominada "serie eluotrópica" (polaridad creciente de izquierda a derecha): hexano,

ciclohexano, tolueno, éter, cloroformo, diclorometano, THF, acetato de etilo, acetona, etanol, metanol, agua.

De nuevo, es importante recordar que en la elección adecuada de la mezcla de disolventes radica el éxito de la separación en la cromatografía de revelado.

Las placas de cromatografía comerciales portan un agente fluorescente inorgánico en la fase estacionaria. Ello permite visualizar el cromatograma iluminando la placa con una lámpara de luz ultravioleta UV. Los diferentes compuestos aparecen en la placa como *manchas* circulares. Las distintas manchas

Por su simplicidad y rapidez, la cromatografía de capa fina es una herramienta muy valiosa en el análisis en el laboratorio de química orgánica. Algunas de sus aplicaciones son:

- La identificación de compuestos conocidos en una mezcla por comparación del cromatograma de la mezcla con el del compuesto conocido.
- La determinación del final de una reacción química: la desaparición de la mancha correspondiente al producto de partida indica la conclusión de la reacción.
- Criterio de pureza: la existencia de una o varias manchas en el cromatograma indica la presencia de uno o varios productos (Casaverde, 2014).

3.3.2.- Fundamentos de la Cromatografía de capa

Proceso de Adsorción: La muestra aplicada en la capa es adsorbida en la superficie del material por la acción de fuerzas electrostáticas (fuerzas de Van der Waals, puentes de Hidrógeno, efectos inductivos, etc.).

Luego, cuando la capa es expuesta a un flujo por acción capilar, se inicia una competencia de enlaces entre los sitios activos del adsorbente y la sustancia con el solvente. Los adsorbentes más utilizados en la Cromatografía de Capa Fina son: cual use yo

- Sílica gel (se utiliza en el 80% de las separaciones)
- Óxido de Aluminio ó Alúmina (ácida, neutra ó básica)
- Tierra Silíceá ó Kieselguhr
- Celulosa (Nativa o micro-cristalina)
- Poliamidas

Estos adsorbentes deber tener las siguientes características:

- Tamaño de Partícula
- Volumen de Poro
- Diámetro de Poro
- Área Superficial
- Homogeneidad
- Pureza (Casaverde, 2014)

3.3.3.- Preparación de la Placa Cromatografía

Se usan como soporte del adsorbente láminas de: Vidrio, Plástico ó Metálicos (ej: Aluminio). Los tamaños de la placa para TLC convencional son: 20 x 20; 10 x 20 y 5 x 2. Hay placas que contienen un indicador de Fluorescencia: F₂₅₄ ó F₃₆₆. El número que aparece como subíndice nos indica la longitud de onda de excitación del indicador utilizado (Yané, 2008)

Aplicación de la muestra

La muestra se aplica en la placa según el objetivo: Analítico ó Preparativa en:

- Banda
- Punto ó Mancha

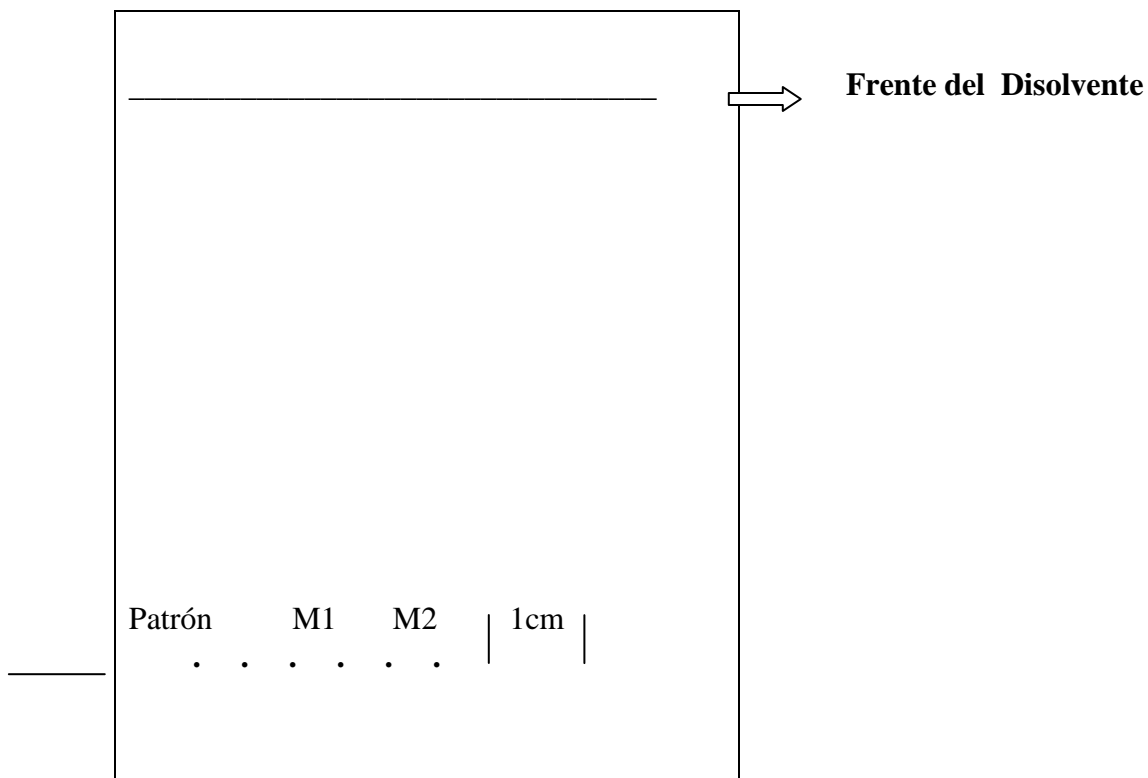


Figura 7. Aplicación de la muestra por cromatografía de capa fina (CCF)

Frente del Disolvente: se denomina así a la distancia que debe recorrer el solvente. En la mayoría de los casos se toma una distancia de 10 cm que parte desde el punto de siembra de la muestra en la placa.

Se debe tomar en cuenta una separación aproximada de un cm entre cada siembra de muestra para evitar así errores en la técnica.

De la parte inferior de la placa hacia arriba se debe medir aproximadamente de 1 a 2cm, dependiendo del tamaño de sistema (tanque) a utilizar, esto con el propósito de evitar que el solvente solubilice la sustancia en el tanque.

Para el proceso de siembra de muestra en la placa cromatográfica se debe utilizar un capilar fino y se procede a aplicar el extracto (aproximadamente 10 a 15 veces de manera uniforme para cada muestra), asegurándose de dejar secar bien entre cada aplicación.

Es importante utilizar una sustancia patrón previamente solubilizada, extraída, y concentrada por evaporación. En el caso de la siembra del patrón, no se hace tantas veces debido a que la concentración es mayor que cualquier muestra (Yané, 2008)

Elección del Solvente

La elección del disolvente dependerá de la naturaleza del compuesto a separar y del material donde se va llevar la separación. Una regla para la escogencia del disolvente es la comparación de la polaridad del mismo y la de la sustancia a separar. Por ejemplo: Eter de petróleo > hexano > Benceno > Eter etílico > cloroformo > acetato > dicloroetano > 2 – butanol > acetona > Etanol > metanol > agua.

Dentro de las características que debe poseer el solvente ideal están:

- Estable al aire.
- De fácil remoción de la placa después del recorrido
- No tóxico
- No reactivo con las sustancias a separar (Yané, 2008)

Cámaras para Desarrollo

Existen varios tipos de cámaras:

- Normal
- Doble Compartimiento
- Sandwich
- Horizontal
- Vario KS
- U

Desarrollo de la Placa

Es un proceso mediante el cual son transportados a través de la fase estacionaria por la fase móvil, los analitos que se encuentran en la muestra. Se introduce la placa uniformemente en la cámara de desarrollo saturada y se deja recorrer la fase móvil hasta el frente del disolvente, para finalmente retirarla de la cámara y dejarla secar completamente.

Sistemas para cromatografía:

- ✓ Sistema T1: Utilizado para Bases nitrogenadas y alcaloides.

Amoniacó.....1,5 ml

Metanol.....100ml

Este sistema se activa con unas gotas de hidróxido de amonio para saturar la cámara y activar la placa.

- ✓ Sistema para Clorados:

n- hexano70ml

Cloroformo.....30ml

Ácido acético.....0.5ml

- ✓ Sistema T – 11 (Cannabis) – Marihuana.

Tolueno.....100ml

- ✓ Sistema Organofosforados.

Cloroformo30 ml

n- hexano70 ml

Acetona..... 2 ml

Este sistema se activa con unas gotas de Acetona para saturar la cámara y activar la placa.

✓ Sistema Barbitúricos:

Cloroformo.....90ml

Cloroformo.....85ml

Acetona10ml

Éter Etílico.....15ml

Estas cámaras o sistemas deben ser previamente saturados o activados: se logra adicionando gotas de los componentes y con la inclusión de un papel de filtro adherido a las paredes del recipiente.

3.3.4.- Evaluación de un Cromatograma de Capa Fina

Análisis Cualitativo

- Medida de Rf
- Comparación Visual de Color/Intensidad
- Propiedades UV/IR/MS/NMR

Análisis Cuantitativo

- Semi-cuantitativo
- Comparación visual del diámetro y la intensidad del color de la mancha contra una serie de manchas patrones de concentración conocida
- Cuantitativo
- Indirecta
- Directa
- Densitometría
- Medida de Transmisión. Medida de luz transmitida a través de la sustancia.
- Medida de Emisión. Medida de luz reflejada desde la sustancia

- Espectrofotometría
- Fluorescencia
- Fluorescencia con "quenching"

3.3.4.- Revelado cromatografico

Si la muestra (mancha) no es coloreada se requiere de métodos que nos permitan visualizar el(los) componente(s) presentes. También se conoce este procedimiento como Revelado.

El revelado de las placas cromatográficas se realiza a través de dos medios:

3.3.4.1.- Revelado por medios químicos:

Generalmente se utiliza para compuestos orgánicos: vapores de yodo o de ácido sulfúrico. (Origina productos oscuros).

Ejemplos:

Reactivo de Dragendorf: sales de Alcaloides.

Fast – Blue: Marihuana.

3.3.4.2.- Revelado por medios Físicos:

Lámpara de la Luz U.V.: Irradiando la placa a una longitud de onda de 254 – 360 nm., previa preparación del absorbente con un material fluorescente. Ej Fluoresceína.

Este tipo de revelado es muy útil en la CCF preparativa, donde una vez localizado el analito este puede ser extraído del absorbente e identificado por otro método analítico.

Método de Elusión: Identificación de los analitos separados también se puede confirmar o establecer raspando y disolviendo la mancha. En este caso se raspa la zona de la placa que contiene el analito mediante una espátula, recogiendo el sólido sobre un papel satinado. A continuación se transfiere a un tubo de ensayo, donde el analito se disuelve con un disolvente adecuado y separando la fase estacionaria.

3.3.4.5.- Determinación del factor de resolución

Las drogas separadas y las standards son visualizadas por medio del uso de luz ultravioleta o reveladores cromatográficos. La distancia recorrida por la mancha es anotada entre distancia recorrida por el solvente.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la mancha}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$

Los valores R_f obtenidos para los compuestos desconocidos son comparados con los obtenidos de los standards.

El valor R_f puede ser influenciado por:

1. La composición de la mezcla del solvente
2. La distancia recorrida por el solvente
3. La concentración de la solución
4. La presencia de otras sustancias
5. La temperatura en el momento del desarrollo
6. Dos compuestos diferentes podrían tener el mismo valor de R_f y están representados por la misma mancha en la placa.

3.5.- Cromatografía de gases (GC)

La fase móvil es un gas inerte y este tipo de cromatografía puede subdividirse según el fenómeno aplicado:

3.6.- Cromatografía gas-líquido. La fase móvil es un gas y la fase estacionaria es un líquido inmovilizado por impregnación o por enlace sobre un soporte inerte que puede ser simplemente la pared de la columna. También está implicado el coeficiente de reparto K .

Fueron Martin y Synge quienes sugirieron la sustitución de la fase móvil líquida por un gas para mejorar las separaciones.

3.7.- Cromatografía gas-sólido. La fase estacionaria es un sólido poroso (grafito o gel de sílice o aluminio) y la fase móvil es un gas. Este tipo de GC es muy efectiva para análisis de mezclas de gases o de compuestos con bajo punto de ebullición. El parámetro implicado es el coeficiente de adsorción.

4.0 .- ESPECTROMETRÍA: “Es un conjunto de método de análisis basado en la medición de espectros”, esta medición se refiere a la potencia o cantidad de energía presente en un espectro o a la posición o configuración de cada espectro (**Morales, 2018**).

Espectro: Conjunto de vibraciones armónicas y simples pertenecientes a una onda.

Espectro electromagnético: “se halla formado por todas las radiaciones electromagnéticas que se conocen”

- ✓ Luz U.V (100-380nm)
- ✓ Luz visible (380-750nm)
- ✓ Luz Infrarroja (780-1.00.000nm)

Radiaciones electromagnéticas: Se define como cualquier tipo de energía que viaja por el espacio a la velocidad de la luz, adoptando diferentes formas, diferenciándose unas de otras en su forma de actuar sobre la materia. (**Morales, 2018**).

Luz Ultravioleta:

- ✓ Lejano UV (100-185nm)
- ✓ Cercano UV (185-380nm)

Zona visible (380-780nm) {
Violeta (380-425nm)
Azul (425-480nm)
Verde (480-560nm)
Amarillo (560-575nm)
Anaranjado (575-600nm)
Rojo (600-780nm)

4.1.- TEORÍA DE ORBITALES MOLECULARES

Cuando dos átomos forman un enlace químico, los orbitales atómicos de cada uno de ellos se combinan para formar dos orbitales moleculares, uno de baja energía que es el orbital enlazante y otro de energía mayor, que es el orbital antienlazante (Figura 1). Los enlaces covalentes que se originan entre los orbitales de dos átomos que se enlazan químicamente pueden ser de dos tipos y se conocen como enlaces σ y enlaces π (Skoog, *et al.*, 1998).

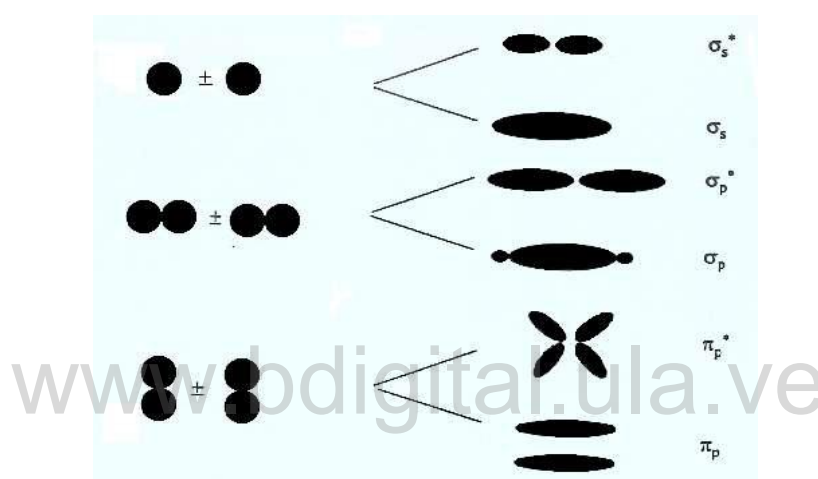


Figura 8.- Formación de los orbitales σ y σ^* por traslapamiento frontal de dos orbitales atómicos s y p, así como enlaces π y π^* por traslapamiento lateral de los orbitales p. (Skoog, *et al.*, 1998).

Al efectuarse dicho enlace covalente se forman simultáneamente orbitales antienlazantes: σ^* en el caso de un orbital molecular enlazante σ y π^* en el caso de un orbital molecular enlazante p.

Los electrones que no participan en la formación de enlaces covalentes en la molécula, se denominan electrones *n* o no enlazantes. En las moléculas orgánicas los electrones *n* están localizados principalmente en los orbitales atómicos de átomos como: Nitrógeno, Oxígeno, Azufre y del grupo de los halógenos.

El diagrama de energía para los orbitales moleculares enlazante, antienlazante y no enlazante así como las transiciones electrónicas posibles es el mostrado en la Figura 2.

La absorción de energía radiante en el Ultravioleta o Visible por los electrones n , σ ó π resulta en la excitación de éstos, los cuales pasan a ocupar alguno de los orbitales antienlazantes. La absorción de radiación Ultravioleta o Visible es capaz de efectuar dichas transiciones.

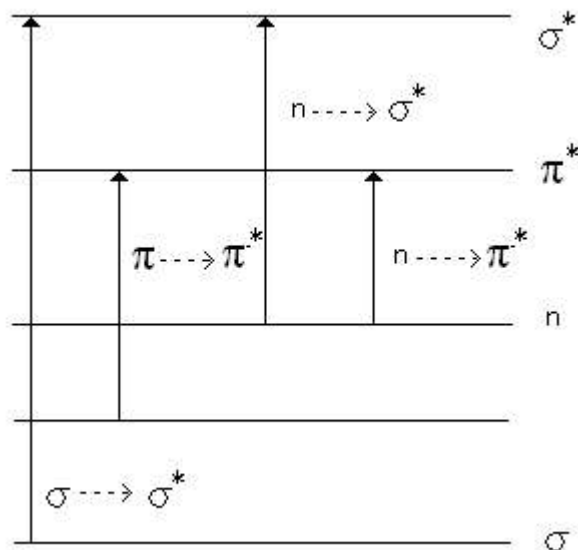


Figura 9.- Diagrama de niveles energéticos para diferentes orbitales moleculares y las transiciones posibles en éstos. (Skoog, *et al.*, 1998).

En la Figura 9 se representan las transiciones posibles en una molécula. De acuerdo a este diagrama el orden energético en estas transiciones el de mayor energía es $\sigma \rightarrow \sigma^*$ y el de menor energía $n \rightarrow \pi^*$

Mientras mayor sea la energía requerida para una determinada transición, menor es la longitud de onda de la radiación que debe suministrarse para conseguir tal fin; por ejemplo: la transición $\sigma \rightarrow \sigma^*$ para el propano requiere de radiación de 135nm, la cual se encuentra en la región del Ultravioleta lejano por lo que es necesario un equipo de alto vacío si se desea estudiar dicha región del espectro. La transición $n \rightarrow \pi^*$ es la que requiere de menor energía y mayor longitud de onda. Las cetonas y aldehídos saturados efectúan esta transición a una longitud de onda de aproximadamente 285nm.

Es necesario hacer notar que asociado a estas transiciones electrónicas existen cambios rotacionales y vibracionales en la molécula lo cual origina que el espectro obtenido se aun espectro de bandas y no un espectro de una o más líneas agudas, como sí ocurre en un átomo.

Espectro electrónico: Algunos términos utilizados muy frecuentemente en espectroscopia UV y Visible son: cromóforo, auxocromo, efecto batocrómico y efecto hipsocrómico.

La mayoría de las aplicaciones de la espectroscopia de absorción a compuestos orgánicos se basa en transiciones de electrones n ó π al estado excitado π^* , ya que las energías que se requieren para estos procesos conducen a picos en una región espectral conveniente experimentalmente (200-700nm), ambas transiciones requieren la presencia de un grupo funcional que suministre los orbitales π . Hablando estrictamente, es a estos centros absorbentes insaturados a los que se les aplica el término **CROMÓFORO**.

AUXOCROMO: Es un grupo funcional que no absorbe por si solo en la región del ultravioleta pero tiene en efecto de desplazar los picos de los cromóforos hacia longitudes de onda largas, además de aumentar su intensidad.

Los picos asociados a transiciones $n \rightarrow \pi^*$ se desplazan, generalmente, hacia longitudes de onda más cortas (un desplazamiento hacia el azul) a medida que aumenta la polaridad del disolvente. Este efecto se conoce como **efecto hipsocrómico**

En los sistemas en que son posibles transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$, el estado excitado es más polar que el estado basal; como resultado de esto, la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ ocurrirá a mayores longitudes de onda en solventes polares que en solventes no polares. Este desplazamiento hacia el rojo del espectro visible se conoce como **efecto batocrómico**.

Disolventes: Las consideraciones que se tienen que hacer al elegir un disolvente no solo con respecto a su transparencia, sino también respecto a sus posibles efectos sobre el sistema absorbente. Normalmente, los disolventes polares tales como el agua, alcoholes, ésteres y cetonas tienden a eliminar la estructura fina del espectro como resultado de los efectos vibracionales. Se observan más fácilmente en disolventes no polares como los

hidrocarburos. Además, las posiciones de los máximos de absorbancia están afectados por la naturaleza del disolvente.

Entre los disolventes comunes para espectroscopia UV se incluyen el agua, el etanol del 95%, el ciclo hexano y el 1,4 dioxano.

El disolvente no debe absorber radiación en las bandas de estudio, de ahí la importancia de conocer las transiciones electrónicas de un disolvente.

4.2.- LEYES FUNDAMENTALES DE LA ESPECTROSCOPIA

Espectrofotometría: Es una rama de la espectrometría la cual se fundamenta en determinar la cantidad de energía absorbida o emitida por una muestra problema en estudio o análisis la cual es directamente proporcional al número de átomos o moléculas presentes en el espacio de la materia (Morales, 2018).

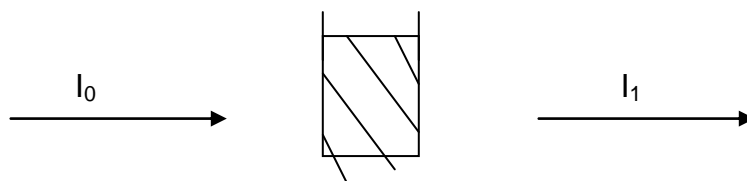
Colorimetría: Es una rama de la espectrometría la cual se utiliza para determinar muestras coloreadas en la zona visible.

Zona visible= muestras líquidas coloreadas.

Zona ultravioleta= muestras líquidas incoloras.

4.2.1.-Leyes de la absorción

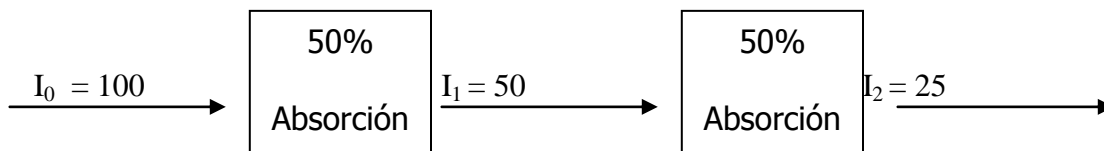
Según el material elaborado por el profesor José G. Salazar Espectroscopia de absorción molecular Uv-visible cuando un haz de luz pasa a través de una solución que absorbe radiación, parte del haz es absorbido. Si I_0 es la intensidad de un haz de radiación monocromática que incide sobre una solución, e I_1 es la intensidad de la radiación emergente:



La relación entre I_0 e I_1 se denomina **transmitancia**:

$$T = \frac{I_0}{I_1}$$

Si examinamos el fenómeno en términos de cantidad de luz absorbida:



Este fenómeno se puede explicar, mediante las siguientes leyes:

4.2.1.1.- Ley de Lambert (o Bouguer): La cantidad de luz absorbida o *absorbancia* (A), depende de la *absortividad* (a) del líquido y de la *longitud del trayecto óptico* (b) a través de la solución, en el supuesto de que la longitud de onda (λ) y la muestra permanezcan constantes,

$$A = a \cdot b$$

4.2.1.2.-Ley de Beer: Relaciona la transmitancia con la *concentración* C de la solución. En consecuencia, para un trayecto óptico dado, la absorción vendrá dada por:

$$A = a \cdot C$$

4.2.1.3.-Ley de Beer-Lambert: Establece una relación lineal entre la absorbancia y la concentración, al mantener constantes b y la longitud de onda. Al medir la relación I_1 / I_0 se puede determinar la absorbancia y con ella calcular la concentración. Si bien la Ley de Beer se mantiene a bajas concentraciones, es frecuente observar desviaciones a concentraciones más elevadas.

$$A = a \cdot b \cdot C$$

El coeficiente de absorción es dependiente de la temperatura, disolvente, estructura molecular y longitud de onda. Esta ley es la piedra angular de la espectroscopia de absorción colorimétrica y ultravioleta.

4.2.2.- Desviaciones de la Ley de Beer: Son interferencias que provocan errores en la medida de la intensidad de radiación que atraviesa la muestra y son producidas principalmente por:

- Impurezas.
- Desplazamiento del equilibrio.
- Anchura de la rendija óptica (menor o mayor paso de radiación)
- Dimerización del compuesto.
- Interacción con el disolvente.

El posible error analítico puede superarse construyendo curvas de calibración, que muestran la relación experimental entre A y C de las muestras utilizadas.

Zona U.V= cuarzo

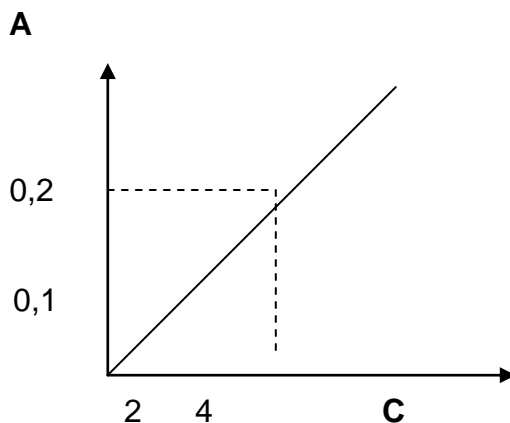
Zona V= vidrio

Absorbancia: Es una función adimensional ya que es una expresión logarítmica de la cantidad de luz que pasa de la muestra en blanco y las que pasa por el analito (**Morales, 2018**).

Espectro de absorción o barrido: Son graficas que se construyen en cualquier sitio del espectro electromagnético con puntos máximos ascendentes y puntos mínimos descendentes correspondiendo a un punto máximo, lo que se conoce como longitud de onda de máxima absorbancia o longitud de onda de trabajo (**Morales, 2018**).

4.2.3.-Curvas de calibración

El método de la curva de calibración permite determinar la concentración de una sustancia, mediante la preparación de una serie de patrones y realizando una lectura de la absorbancia a una longitud de onda específica. De igual manera, se debe determinar la absorbancia de la muestra para luego con los datos obtenidos construir una curva y por extrapolación calcular la concentración de la muestra.



Sin embargo, podemos calcular la concentración de la muestra utilizando la *ecuación de Beer-Lambert*, siempre y cuando la lectura se realice en las mismas condiciones de reactivos y solventes:

$$C_m = \frac{A_m}{A_p} \times C_p$$

Donde:

C_m = concentración de la muestra

A_m = absorbancia de la muestra

A_p = absorbancia del patrón

C_p = concentración del patrón

4.2.4.-Selección de la longitud de onda analítica y espectros de absorción

La longitud de onda para un determinado análisis se selecciona de tal manera que el material de interés absorba la luz a dicha longitud de onda. En un espectrofotómetro, la longitud de absorción máxima se determina fácilmente en base a la curva de absorbancia-longitud de onda (espectro de absorción).

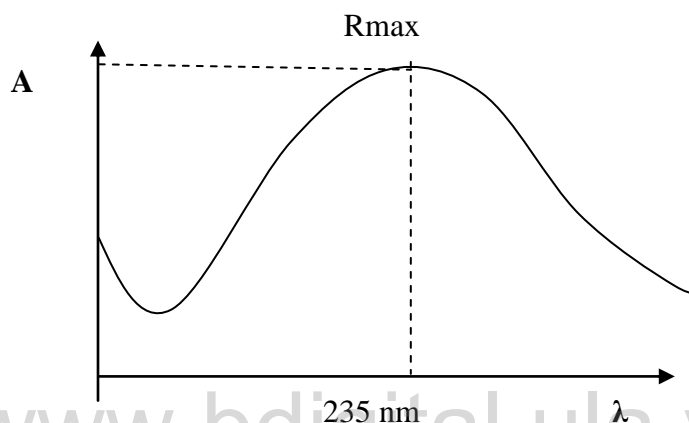


Figura 10. Espectro de absorción. Tomado de la guía de Laboratorio de Toxicología General de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes. (Salazar, 2008).

Al medir la absorbancia de una solución a diferentes longitudes de onda se comprueba que la muestra absorbe fuertemente a ciertas longitudes de onda y mucho menos a otras. El rango de longitud de onda para la región UV varía entre los 225 a 350 nm.

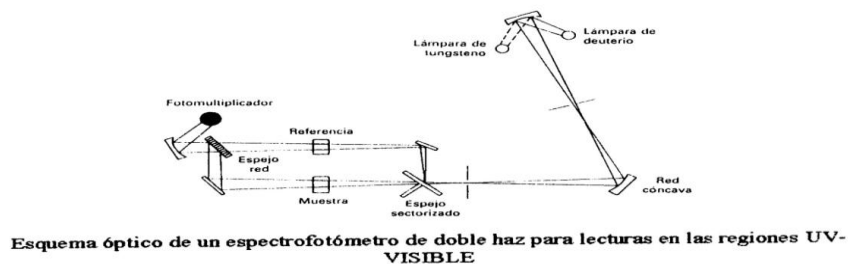


Figura 11. Espectrofotómetro de doble haz para lecturas en las regiones UV-visible. Tomado de la guía de Laboratorio de Toxicología General de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes. **(Salazar, 2008).**

4.3.- ESPECTROSCOPIA UV VISIBLE.

La espectroscopia UV-Vis está basada en el proceso de absorción de la radiación ultravioleta-visible (radiación con longitud de onda comprendida entre los 160 y 780nm) por una molécula. La absorción de esta radiación causa la promoción de un electrón a un estado excitado. Los electrones que se excitan al absorber radiación de esta frecuencia son los electrones de enlace de las moléculas, por lo que los picos de absorción se pueden correlacionar con los distintos tipos de enlace presentes en el compuesto. Debido a ello, la espectroscopia UV-Vis se utiliza para la identificación de los grupos funcionales presentes en una molécula. Las bandas que aparecen en un espectro UV-Vis son anchas debido a la superposición de transiciones vibracionales y electrónicas **(Aguirre, 2018).**

El espectro Ultravioleta y Visible de las moléculas está asociado a transiciones electrónicas entre los diferentes niveles energéticos en ciertos grupos o átomos de la molécula y no caracterizan a la molécula como entidad.

En contraste la absorción de energía en la región Infrarroja estimulan la molécula completa y causa cambios vibracionales y rotacionales en esta lo cual caracteriza la entidad estructural de dicha molécula.

Los grupos de átomos que dan origen a la absorción en el UV cercano o UV de cuarzo, se conocen como grupos cromóforos. La mayoría de los grupos insaturados y heteroatómicos que tienen pares de electrones no compartidos, son cromóforos potenciales y estos grupos son la base de la elucidación de grupos estructurales en las moléculas activas en el UV cercano **(Skoog, et al., 1998).**

4.3.1.- VENTAJAS QUE POSEE LA ESPECTROSCOPIA UV-VIS COMO TÉCNICA EN EL ANALISIS DE VINOS ARTESANALES.

Las técnicas analíticas UV-Visible han recibido gran aceptación debido, entre otras a las siguientes razones:

- 1. Amplio campo de aplicación:** Como ya se ha mencionado, las técnicas espectroscópicas UV-Vis., son ampliamente empleadas ya que son muchas las especies que son activas en el Visible, y muchas más las que con un tratamiento adecuado son capaces de formar especies coloridas. Lo mismo puede decirse de la espectroscopia UV.
- 2. Selectividad adecuada:** Aunque no es muy común si es posible tener interferencias en UV-Visible. Cuando esto ocurre, es posible emplear los métodos para análisis de multicomponentes. Otra alternativa es aislar el analito de la interferencia, o separa la interferencia misma.
- 3.- Buena Exactitud y Precisión:** En estas técnicas espectroscópicas es normal tener errores relativos del 1 al 3 %, por lo cual se puede considerar que se tendrán resultados analíticos con un mínimo de incertidumbre si se procede en la forma correcta.
- 4.- Facilidad y Conveniencia:** Aunque existen instrumentos altamente sofisticados acoplados a computadoras y con sistemas ópticos y electrónicos de alta precisión, es posible obtener resultados muy aceptables para análisis de rutina, con instrumentos o espectrofotómetros de los más sencillos en el mercado, a un costo muy accesible (Skoog, *et al.*, 1998).

4.4.- INTERPRETACIÓN Y USOS DE LA ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA

El espectro Ultravioleta de una molécula se obtiene generalmente en forma adicional al espectro infrarrojo de la misma especie. Este espectro IR frecuentemente sirve como dato confirmativo de la ausencia o presencia de ciertos grupos funcionales.

En algunos casos la espectroscopia UV puede ser fundamental para el estudio de ciertos problemas específicos. Por ejemplo en la industria de los cosméticos, tintes, colorantes y pinturas. El estudio de los grupos auxocromos y de su influencia en el desplazamiento de

ciertos compuestos químicos hacia la región visible hacen de esta técnica una de las de mayor interés en ésta área.

Desde el punto de vista del estudio estereoquímico y de grupos funcionales en una molécula orgánica, la espectroscopia UV no rivaliza con otras técnicas que tienen el mismo propósito, especialmente con la espectroscopia IR por las razones mencionadas anteriormente, sin embargo su aplicación en la cuantificación de sustancias que absorben radiación UV la hacen una técnica insustituible.

Existe un gran número de técnicas para determinar sustancias que no tienen un número suficiente de grupos cromóforos para que la banda de absorción esté dentro del espectro Visible; por ejemplo ácidos orgánicos, alcoholes, fenoles, aldehídos, cetonas, etc. Muchos de este tipo de compuestos muestran al menos una banda de absorción en el UV cercano y tomando como dato su longitud de onda de máxima absorbancia se pueden cuantificar en la misma forma en que se determina compuestos en espectroscopia Visible.

Es posible determinar un gran número de sustancias como son: ácido ascórbico, fructuosa, glicerol, ácido 1-glutámico, lactosa, galactosa, maltosa, glucosa, rafinosa, dsorbitol, etanol, ácido acético, etc. Estas técnicas analíticas son de múltiples aplicaciones en bioquímica general y bioquímica de alimentos, y esta es la razón de su importancia. En Química Clínica también son muy utilizados los métodos de espectroscopia UV (Skoog, *et al.*, 1998).

5.0.- EXTRACCIÓN DE ORGANOFOSFORADOS UTILIZANDO EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DISCONTINUA.

La extracción es la técnica empleada para separar un producto orgánico de una mezcla de reacción o para aislarlo de sus fuentes naturales. Puede definirse como la separación de un componente de una mezcla por medio de un disolvente. El procedimiento consiste en agitarlas con un disolvente orgánico inmiscible con el agua y dejar separar ambas capas.

6.0.- VINO

Es la bebida obtenida de la fermentación alcohólica, total o parcial, del mosto de uva o de las uvas mismas. Con esta definición descartamos que existan vinos que no sean procedente de uvas: No existe el vino de peras, ni de cerezas..., esos son nombres inapropiados que es frecuente encontrar en los más diversos lugares (**Tigrino, 2012**).

6.1.- TIPOS DE VINO

Existen diferentes clasificaciones para los vinos, nos centraremos en las tres que creemos más prácticas y generales:

- Clasificación General: es la más usada y la más importante. Clasifica a los vinos según su forma de elaboración, abarcando todos los tipos posibles :

Clasificación General:

- **Vinos tranquilos:** Blancos, Rosado y Tinto.
- **Vinos especiales:** Generosos, Licorosos Generosos, Dulces Naturales, Mistelas, Espumosos Naturales, Gasificados, Enverados, Chacolís (Rial-Otero, 2002).
- **Vinos Artesanales:** Los vinos son frutos de una producción innovadora y del trabajo manual dedicado. Por eso los convierte en productos exclusivos de excelente calidad, únicos y especiales; no solo porque en su elaboración artesanal hay una selección cuidadosa de las frutas, sino también un proceso minucioso que prescinde de insumos químicos (**Díaz, 2016**).

6.2.- FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE VINOS ARTESANALES:

6.2.1.- Materia prima

Este es uno de los aspectos más importante a considerar cuando se habla del procesamiento de frutas. Son las frutas en sí, la materia prima, el motivo mismo del

desarrollo de los procesos de conservación. La abundancia de especies que son susceptibles de ser industrializadas solo hace posible una breve mención de alguna de ellas, debiendo dedicar más espacio al grupo de especies que son de común ocurrencia general (Díaz, 2016).

6.2.3.- Descripción del proceso de Producción: El proceso de elaboración de vinos artesanales cumple con las siguientes etapas:

- **Recepción:** Consiste en cuantificar la fruta que entrara a proceso. Esta operación debe hacerse utilizando recipientes adecuados.
- **Lavado:** Se hace para eliminar bacterias superficiales, residuos y suciedad adherida a la fruta. Se debe utilizar agua clorada.
- **Selección:** Se elimina la fruta que no tenga el grado de madurez adecuado o presente golpes o magulladuras.
- **Preparación de la fruta:** La eliminación de la cascara permite ablandar más rápidamente la fruta, así como obtener un producto de mejorar calidad. (Esta operación depende de la fruta de la cual se quiera hacer vino), puede realizarse manual o mecánicamente. Si se hace mecánicamente, existen en el mercado una variedad de modelos de peladoras o bien construirse de forma casera. La preparación puede incluir un escaldado que permita por una parte desactivar la acción enzimática y por otra ablandar los tejidos de la fruta para facilitar la extracción de la pulpa.
- **Extracción de la pulpa:** Se hace por medio de un despulpador o bien licuando la fruta (licuadora industrial).
- **Extracción del jugo:** Se hace con una prensa manual o hidráulica. O bien la pulpa obtenida en la fase anterior, se hace pasar por un colador, para obtener el jugo. En esta parte la pulpa debe estar a 70°C, para evitar el oscurecimiento y garantizar el sabor, el olor y el color.
- **Preparación del mosto:** al jugo obtenido en la etapa anterior se adiciona una solución de agua azucara al 20%, levadura al 2% en relación al mosto. El nutriente, que puede ser fosfato de amonio, se agrega en una proporción de 1 gramo por litro aproximadamente.

- **Fermentación:** en este paso se coloca una trampa de aire, para evitar su oxidación a vinagre. La mezcla se deja fermentar en barriles, entre 3 y 7 días como mínimo, a una temperatura a 30°C. la fermentación se interrumpe cuando ya no hay producción de gas.
- **Trasiego:** consiste en separar la parte superior del fermento, mediante succión. Durante el fermento existe una separación de fases, quedando el vino en la parte superior y residuos de fruta o levadura en la parte inferior.
- **Filtrado:** se hace pasar la mezcla fermentada por una tela fina o colador, previamente esterilizado, para eliminar la levadura y la pulpa residuales.
- **Envasado:** por lo general, se hace en botellas de vidrio. Los envases deben esterilizarse sumergiéndolos en agua caliente (95°C) durante 10 minutos.
- **Sellado:** el sellado puede hacerse manual o mecánicamente. Es frecuente que el tapón de la botella sea de corcho (Díaz, 2016).

6.3.- PROCESO PARA LA ELABORACIÓN DE VINOS ARTESANALES

Los pasos para la elaboración del vino, son los siguientes:

- Se realiza el control de calidad y selección del fruto en calidades óptimas.
- Se procede a limpiar las frutas por completo, tratando de evitar no dañar la corteza del fruto (aceites útiles para el proceso), luego se emplea una solución satinizante de 250ppm (25 ml de cloro por litro de agua), para lograr un lavado completo.
- Con la ayuda de una exprimidora industrial, se continúa a la extracción del jugo de la naranja.
- Luego de tener la materia prima preparada con todos los ingredientes necesarios, para su elaboración, se procede a almacenarla en barriles de robles, los cuales deberán estar ubicados en lugares oscuros, a temperaturas de 18°C.
- El líquido deberá estar en reposo aproximadamente 8 días, ya que en ese tiempo se formara en este caso la cachaza de la naranja, que después será

retirado cuidadosamente a través de tamices muy delgados y tratando de evitar mover en lo absoluto el jarabe.

- Luego de ese tiempo se comienza a endulzar con panela o azúcar morena. Y es ahí que el alcohol se produce por la fermentación del azúcar y la naranja, ya que eso producirá levaduras (hongos naturales) existente en la naranja.
- Esta sustancia se deberá mantener en reposo, por 6 meses, con la finalidad de obtener una distribución homogénea de aromas, sabor y dulzor. Y el grado de alcohol, dependerá del año de añejamiento del vino (9°C).
- Como último paso, se realiza el envasado en botellas de vidrios de 750cc(Pazmiño y Aguiar, 2008)

Definición operacional de términos

Operacionalización de Variables

Según Palella y Martins (2010), la operacionalización de las variables es el procedimiento mediante el cual se determinan los indicadores que caracterizan a las variables de una investigación. Esta definición operacional asigna significado a una variable, describiéndola en términos observables y comparables para poder identificarla. Para establecer el sistema de variables es necesaria la definición conceptual y la operacionalización de las mismas, es decir, de las dimensiones y los indicadores de cada una. Por lo tanto, las variables se operacionalizan para convertir los conceptos abstractos en empíricos, con el fin de medirlos a través de un instrumento.

Las Tablas 1 y 2 representan la operacionalización de las variables presentes en la investigación desarrollada, en relación con la Determinación de organofosforados., según los patrones con Paration y Pyrinex en el Departamento de Toxicología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

Tabla 1. Operacionalización de la variable Independiente. Fuente: Autor.

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual
Elaboración de vinos artesanales	Independiente	<p>La Elaboración de vinos artesanales, son productos que cuentan con todo un proceso de elaboración, donde participa todo un conjunto de factores para lograr el mejor resultado, los vinos artesanales son elaborados a partir del procesamiento de la materia prima principal como las uvas, además se conocen vinos elaborados con fresas, duraznos, moras, entre otros, estos productos se encuentran en el mercado principal, del municipio Libertador de la ciudad de Mérida. Autor.</p>
Definición operacional	Dimensiones	Indicador
Cantidad del extracto obtenido por extracción al vacío	<p>Presente</p> <p>Ausente</p>	10 muestras de vinos artesanales

Tabla 2. Operacionalización de la variable Dependiente. Fuente: Autor.

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual
Presencia de organofosforados	Dependiente	<p>La presencia de organofosforado puede producir intoxicación en individuos, y se aplican deliberadamente para que se propaguen en el medio ambiente, su producción, distribución y utilización debe regirse por un control y una reglamentación estrictos. (Fernández, et al., 2010)</p>
Definición operacional	Dimensiones	Indicador
Se puede determinar la presencia de plaguicidas tipo organofosforados a través de ensayos in vivo en placas de cromatografía de capa fina (TLC) en el laboratorio.	Sensibilidad intermedia	<p>Positivo amarillo pálido Hidrolisis alcalina. Positivo violeta Averrel norris.</p>

Hipótesis

Hipótesis Afirmativa (Ha)

Si existen, trazas de plaguicidas tipo organofosforados en vinos artesanales recolectados en el Estado Mérida, durante el periodo de Enero del 2018 a Octubre del 2018.

Hipótesis Nula (Ho)

No existen, trazas de plaguicidas tipo organofosforados en vinos artesanales recolectados en el Estado Mérida, durante el periodo de Enero del 2018 a Octubre del 2018.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

El marco metodológico define los métodos, técnicas, instrumentos, estrategias y procedimientos a utilizar en la investigación que se va a desarrollar. Según Hurtado (2010), la metodología es el área del conocimiento que estudia los métodos generales de las disciplinas científicas, incluyendo los métodos, las técnicas, las tácticas, las estrategias y los procedimientos que utilizara el investigador para lograr los objetivos de su estudio.

Tipo de Investigación

Según Sabino (1986), “La investigación de tipo descriptiva trabaja sobre realidades de hechos, y su característica fundamental es la de presentar una interpretación correcta. Para la investigación descriptiva, su preocupación primordial radica en descubrir algunas características fundamentales de conjuntos homogéneos de fenómenos, utilizando criterios sistemáticos que permitan poner de manifiesto su estructura o comportamiento. De esta forma se pueden obtener las notas que caracterizan a la realidad estudiada”. En este estudio se desarrolla una investigación de tipo descriptiva, debido a la secuencia de procesos que ocurren durante la misma, a través de la recolección de muestras, la observación, frecuencia, promedio, desviación estándar en la aplicación de las técnicas de cromatografía de capa y espectroscopia UVVIS.

Diseño de Investigación

Según Arias (1999), define el diseño de la investigación como “la estrategia que adopta el investigador para responder al problema planteado”. Con base a este argumento, se realizó una recolección de 10 muestras de vinos artesanales en la realidad directamente del fenómeno el cual se determinó plaguicidas tipo organofosforados, por lo cual adopto por un diseño de campo, Según Arias (2004), la investigación de campo “consiste en la recolección de datos directamente de la realidad donde ocurren los hechos, sin manipular o controlar variables alguna”.

Población y Muestra

Unidad de Investigación

Según Tamayo (1998) la población, es la totalidad del fenómeno a estudiar en donde las unidades de población poseen una característica común, el cual se estudia y da origen a los datos de la investigación. Por consiguiente, en este estudio, la población está constituida por diez (10) muestras de vinos., que fueron tomadas y recolectadas en comercios de venta de bebidas artesanales en el Mercado Principal, ubicado en la Parroquia Antonio Spinetti Dini, Municipio Libertador del Estado Mérida y luego trasladadas al Laboratorio de Toxicología Dr. Pablo Paredes Vivas de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes para su tratamiento y análisis; se trataron a través de una extracción orgánica, en donde se realizo por triplicado cada muestra para determinar la precisión y exactitud de las técnicas aplicadas.

Selección del Tamaño Muestral

En cuanto a la muestra es importante destacar que en los estudios cualitativos como lo señalan **Taylor y Bogdan (1990)**, el poder de la muestra no depende del tamaño, sino en qué medida la muestra refleja y maximiza la diversidad del fenómeno estudiado, es decir, “recoge la mayor cantidad posible de visiones, de forma que refleje la amplitud de la variable analizada”. En este sentido, se recolectaron 10 muestras de 10ml cada una de distintas marcas y de diferentes zonas productoras, ya patentadas en el comercio municipal.

Sistema de Variables

Las variables en esta investigación fueron sistematizadas en dependiente e independiente, considerando el marco teórico y los objetivos. La variable dependiente fue: la presencia de organofosforados. La variable independiente fue la elaboración de vinos artesanales.

Procedimiento de la Investigación

Para la determinación de los plaguicidas tipo organofosforados se recolecto 10 muestras de vinos, se realizó una marcha analítica, en donde se descartó la Fase acuoso y se procesó la Fase orgánica, posteriormente le realizamos diferentes pruebas presuntivas por triplicado, de orientación como Hidrolisis alcalina, Averell norris, además de técnicas analíticas como la Cromatografía de capa fina, y Espectrofotometría UV- VIS, el procedimiento a seguir se explicará a continuación:

➤ **Recolección de la muestra de vinos artesanales**

Las muestras de vinos, fueron recolectadas en el Mercado Principal del Estado Mérida para posteriormente ser procesados en el Laboratorio de Toxicología Dr. Pablo Paredes Vivas de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

➤ **Secado y trasvasado del vino recolectado**

Se recolectaron 10 muestras de vinos, elaborados artesanalmente, que fueron destinadas al proceso de trasvasado por triplicado, en recipientes previamente esterilizados, dando un volumen de 10mL cada muestra, por último se rotularon y sellaron para la aplicación de los distintos procesos analíticos seleccionados en el estudio de las muestras.

➤ **Preparación de los extractos**

Una vez tomada la muestra por triplicado, envasada, sellada y rotulada, ajustamos pH a estado neutro con Hidróxido de amonio y fueron sometidas cada una de ellas a un proceso de extracción orgánica durante 10 minutos con 10 ml de la muestra y 20mL del solvente elegido: Cloroformo. El proceso de extracción consistió en poner en contacto el vino con el solvente orgánico durante de 10 minutos a través de un proceso de extracción discontinua con agitación manual. Posteriormente, se procedió a descartar la Fase Acuosa Neutra y se procesó la Fase

Orgánica, colocándola en cuatro capsulas, una para cada prueba presuntiva de orientación. El resto de fase orgánica obtenida se almaceno para su respectivo análisis de cromatografía de capa fina y espectroscopia UV-VIS.

➤ **Determinación de plaguicidas tipo organofosforados**

La determinación de plaguicidas tipo organofosforados se realizó en el Laboratorio de Toxicología Dr. Pablo Paredes Vivas de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la tutoría del Prof. Jacinto Rincón y colaboración del profesional al servicio Farmacéutico Carlos Contreras. Se utilizó en primera fase las pruebas presuntivas de orientación a diez vinos, como son la Hidrólisis alcalina y Averell Norris, luego en segunda fase a seis vinos, las técnicas analíticas con un grado mayor de sensibilidad en donde empleando la Cromatografía de Capa Fina y la Espectroscopia de Absorción UV-VIS. Cada una de las muestras fueron analizadas por triplicado con el propósito de observar si se presentaba alguna variación en los resultados obtenidos y si los procedimientos analíticos aplicados estaban siendo efectivos. Para la determinación de plaguicidas tipo organofosforados específicamente los de uso más frecuente como son el Parathión y Pyrinex; los cuales fueron preparados dos patrones, el Patrón A con unas gotas de Parathión y 5mL de la muestra (vino artesanal); de igual manera para el patrón B unas gotas de Pyrinex y 5 mL de vino artesanal.

➤ **Aplicación de pruebas presuntivas de orientación**

Las pruebas se realizaron a diez muestras de vinos, por triplicado. La primera de ellas fue la Hidrolisis alcalina donde se tomo una porción del extracto orgánico en una cápsula de porcelana y colocado en un baño de maría, utilizando una campana de extracción. Al enfriar se le agrego 2mL de etanol, 2mL de H₂O destilada y 3 o 4 píldoras de NaOH, se procedió a realizarle la lectura, estableciendo como resultado positivo la presencia de un amarillo pálido en la capsula, igualmente para Averell Norris en una capsula de porcelana se colocó otra porción de fase orgánica de la muestra, evaporándose a sequedad total, en baño de

maría por 5 a 10 minutos, posteriormente se le agrego 2mL de etanol, con 2mL de H₂O mezclo y trasvaso a un tubo de ensayo, conjuntamente agrego 0.5mL de HCL [], con 0,05mg de Zn en polvo, calentando en baño de María. Seguidamente se procedió a filtrar en caliente en un embudo con algodón de vidrio y a ese filtrado se le agrego 0,25mL de sulfamato de amonio al 2,5% dejando reposar por 2 minutos. Posteriormente se adiciona 0,5mL de NaNO₂ al 0,1% espero por 3 minutos, y seguidamente se agrega 0,5mL de solución de clorhidrato de N-(1-naftiletilendiamina) al 1%, el resultado será positivo para el color violeta. Ambas reacciones presuntivas de orientación su positividad indica la formación de un compuesto denominado para nitrofenol

➤ **Preparación de los reactivos para Hidrolisis alcalina y Averell norris**

- Revelador: Disolver 0.5g de PdCl₂ en 100mL de HCL a 0.01N
- Sulfamato de amonio al 2,5%: Disolver 2,5g de sulfato de amonio en 100mL de H₂O destilada.
- Nitrito de sodio al 0,1%: Disolver 0,1g de NaNO₂ en 100mL de H₂O destilada.
- Solución de N-(1-naftiletilendiamina) al 1%: Disolver 1g en 100mL de metanol.

**DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS TIPO ORGANOFOSFORADOS
EMPLEANDO EL MÉTODO DE CROMATOGRFÍA DE CAPA FINA Y
ESPECTROSCOPIA UV VISIBLE**

Cromatografía de capa fina

Se realizó una marcha analítica, a seis muestras de vino, por triplicado, ajustamos pH a estado neutro con Hidróxido de amonio y fueron sometidas cada una de ellas a un proceso de extracción con solventes o extracción liquido-líquido con 20mL del solvente elegido: en este caso, éter de petróleo, de creciente polaridad y 10mL de la muestra, mezclando durante

10 minutos en un tubo de decantación, descarto la fase acuosa y la fase orgánica lo llevamos a baño de maría en una capsula de porcelana a precalentamiento y procedemos a sembrar en la placa de cromatografía.

Preparación de la placa, el tanque y aplicación de la muestra

Procedemos a identificar la placa, con lápiz y regla marcamos los espacios de la parte inferior de la placa de abajo hacia arriba se debe medir aproximadamente de 1 a 2cm, dependiendo del tamaño de sistema (tanque) a utilizar, esto con el propósito de evitar que el solvente solubilice la sustancia en el tanque. La placa debe estar previamente identificada con Patrón A, Patrón B, M1, M2, M3, M4, M5, M6 y así sucesivamente deben estar 1cm de espacio entre muestra, marcamos una línea que será hasta donde haga el recorrido la cámara aproximadamente 15cm.

Con un capilar, tomé una pequeña cantidad de la solución-problema aproximadamente 0,5mL en placa de silica de gel y apliqué gota a gota sobre la capa de, a 1 cm. aprox. del borde inferior de la placa (ver Figura 6) (aproximadamente 10 a 15 veces de manera uniforme para cada muestra), asegurándose de dejar secar bien entre cada aplicación.

Se utilizó una sustancia patrón previamente solubilizada, extraída, y concentrada por evaporación. En el caso de la siembra del patrón, no se hace tantas veces debido a que la concentración es mayor que cualquier muestra.

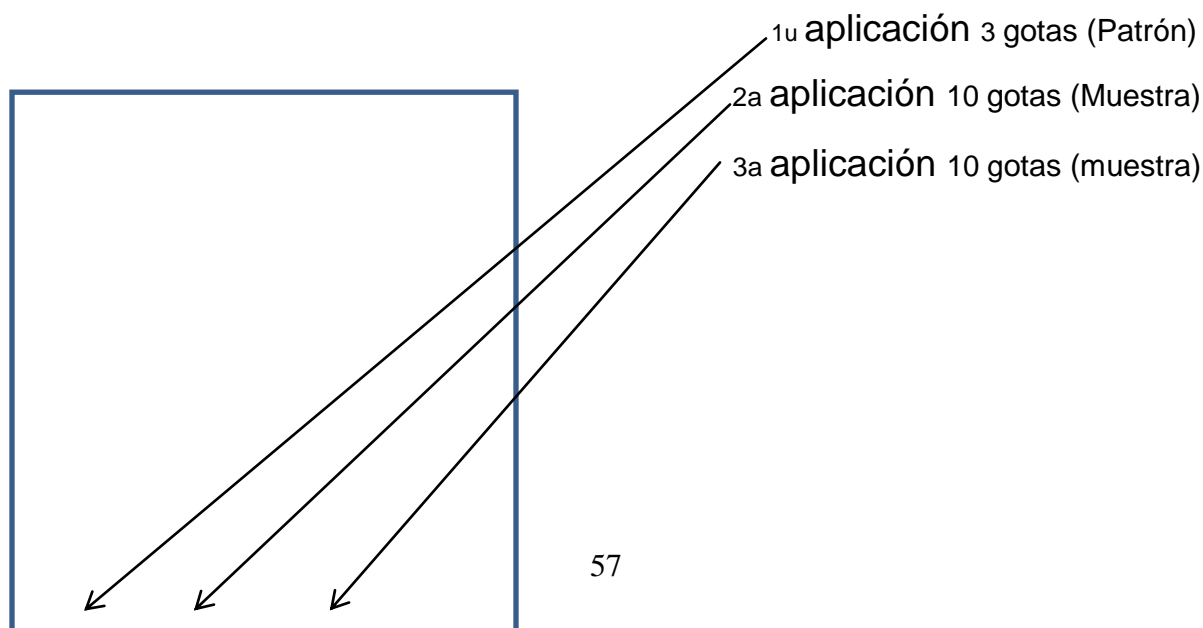


Figura 12. Aplicación de las muestras (Clement. B, 2002)

Posteriormente, se debe preparar la cubeta en la que se va a realizar la cromatografía. Esta cubeta es un simple recipiente de vidrio en donde se añade el eluyente que se va a utilizar:

Fase móvil: Cloroformo30 ml
n- hexano70 ml
Acetona..... 2 ml

Siempre en un nivel inferior a la línea base que se ha dibujado en la placa.

En la cubeta se introduce una tira de papel de filtro para que el vapor del eluyente esté por toda la cubeta.

En este momento se introduce con cuidado la placa en la cubeta y se tapa, esperando a que el nivel del eluyente ascienda por la placa.

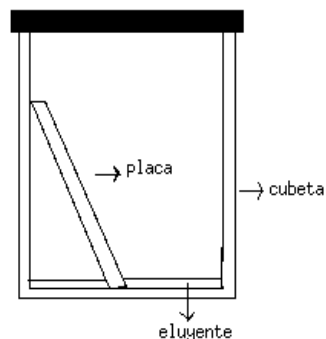


Figura 13.- Modo de colocación de la placa de Cromatografía en el Tanque de la Fase Móvil. Fuente: Autor.

Cuando el nivel se encuentra casi en el borde superior a los 15cm, se extrae la placa y se dibuja una nueva línea en este nivel.

El disolvente al ser volátil se evapora en poco tiempo dejando la placa seca. Ahora se debe buscar un método para visualizar el resultado del cromatograma y ver la separación de los componentes pinchados en la placa.

Para visualizar las manchas, revele primero con la lámpara de luz UV irradiando la placa a una longitud de onda de 254 – 360 nm previa preparación del absorbente con un material fluorescente. Ej Fluoresceína.

Posteriormente procedemos con un spray a rosear en la placa el revelador, previamente preparado, observamos las manchas, medimos a la mitad la mancha con una regla, tomamos nota del recorrido de la mancha y hacemos los cálculos pertinentes.

Preparación del revelador:

- ✓ Revelador: Cloruro de paladio (PdCl₂)
Disolver 0,5g de PdCl₂ en 100mL de HCL al 0.01N.
- ✓ Preparación con HCL al 0,01 N
0,82 mL de HCL [] / 1000mL de H₂O destilada.

Determinación del factor de resolución:

La identificación de cada una de las manchas se realiza de acuerdo con su color y denominado valor r_f (factor de retención, llamado también factor R_f o hR_f ($R_f \times 100$), es decir:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la mancha}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$
$$R_f = \frac{8,5\text{cm (Patrón A)}}{12,5\text{cm}} = 0,68\text{mm Patrón A}$$

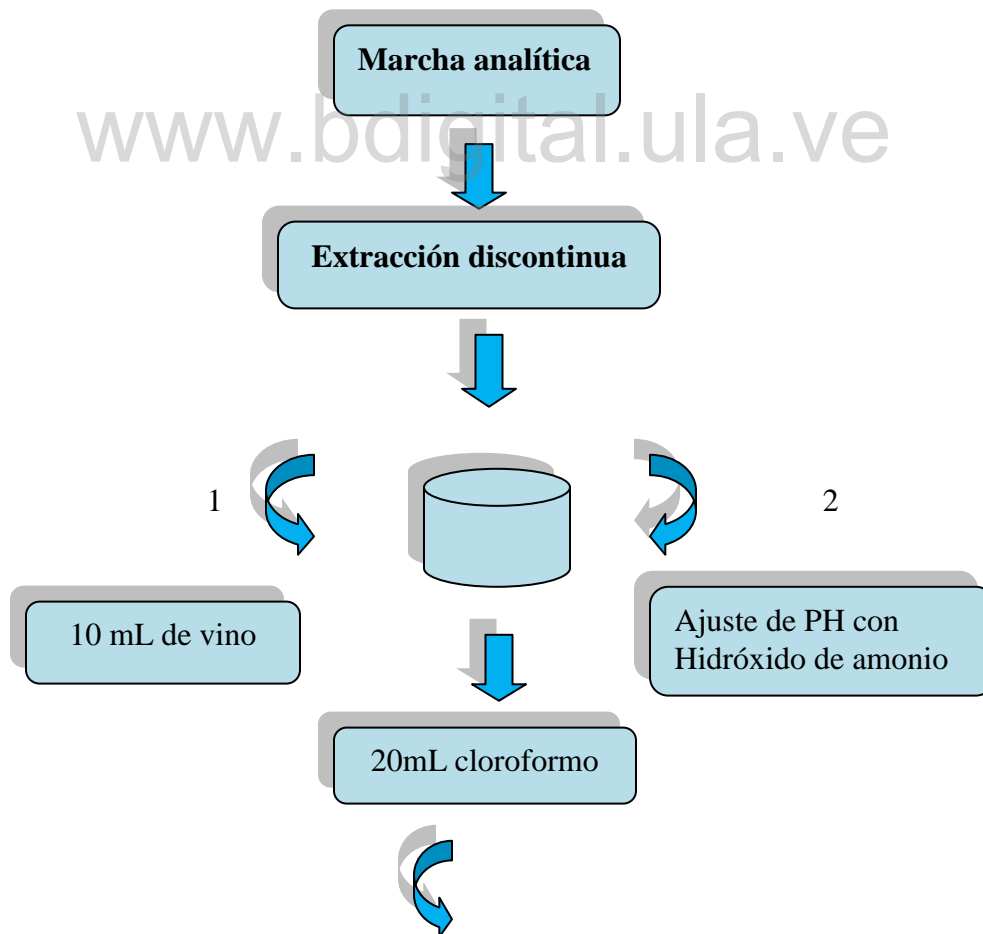
$$R_f = \frac{4,5\text{cm (Patrón B)}}{12,5\text{cm}} = 0,36\text{mm Patrón B}$$

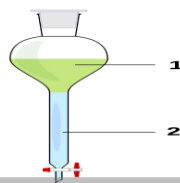
Distancia de recorrido del disolvente 12,5cm

Se procedió a medir a la mitad de la mancha.

Los valores Rf obtenidos para los compuestos desconocidos son comparados con los obtenidos de los estándares.

Esquema 1.- Proceso de extracción discontinua y Cromatografía de capa fina. Fuente: Autor.





Mezclar x 10' y dejar en reposo hasta que separen las 2 fases: Fase acuosa y Fase orgánica

Fase acuosa
(Descartar)

Fase orgánica

Tanque x 5' hasta que la cámara recorra 15cm

Se sembró 0,5mL en placa de silica de gel

Baño maría x 3'

Dejar secar la placa y procedemos a leer los resultados

Lámpara Luz UV a una longitud de onda de 254-360nm

Posteriormente a revelar

Y Finalmente calculamos el Rf-

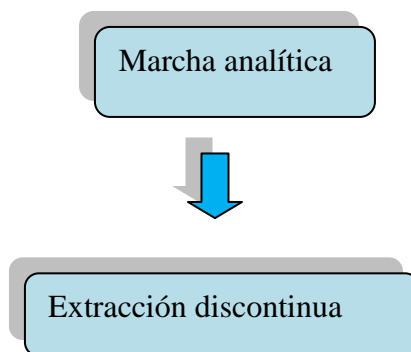
Espectroscopia UV visible

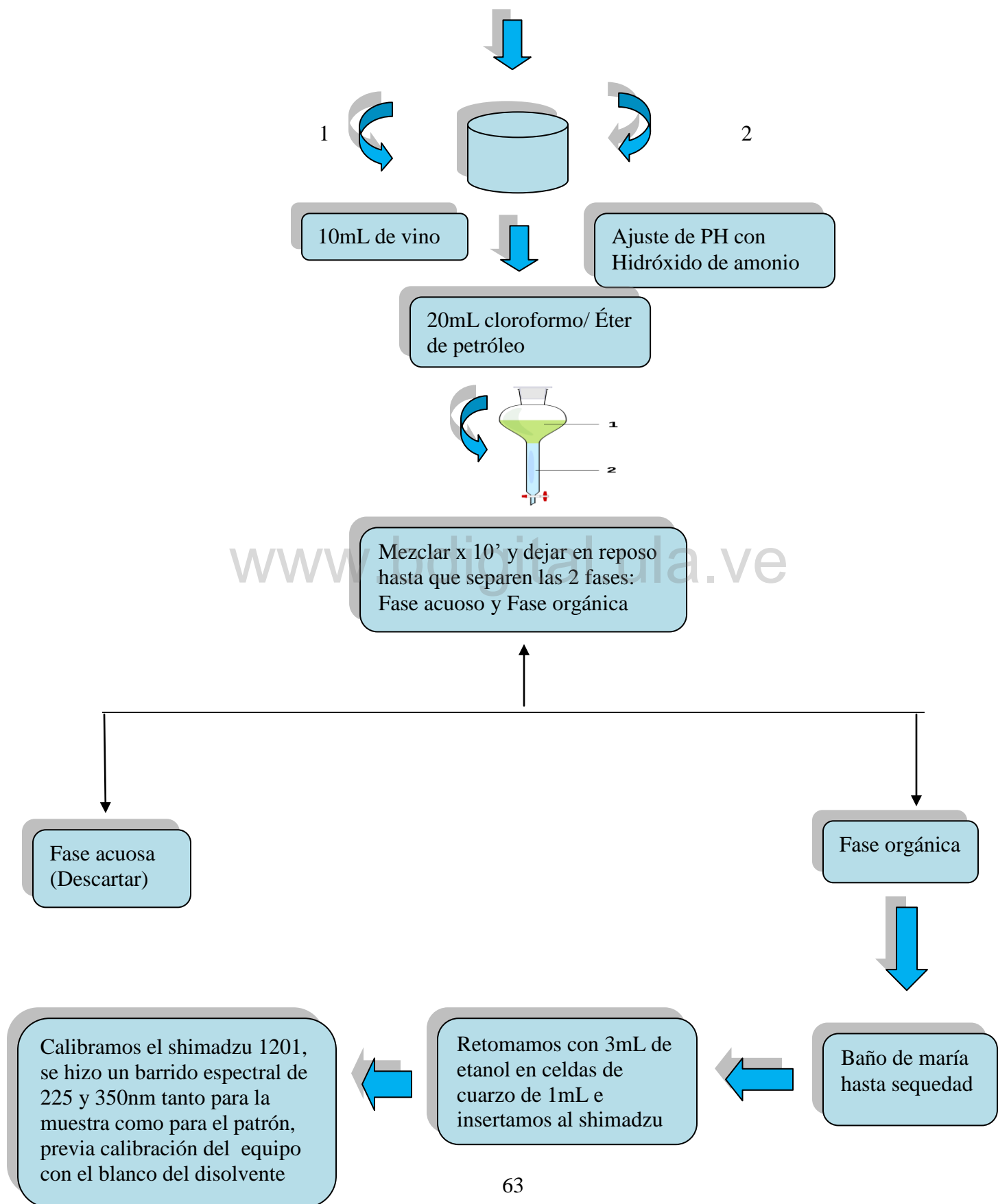
Se realizo esta técnica, a seis muestras de vino fueron analizadas por triplicado, retomamos cada una de ellas, con 3ml de etanol en celdas de cuarzo de un 1mL. Procedimos a calibrar el shimadzu, ubicamos el rango de longitud de onda, se trabajó con una lectura de longitud de onda máxima 400nm y longitud de onda mínima 200nm, calibramos a una velocidad media, se hizo un barrido espectral 225 y 350nm, para colocar en cero Absorbancia al shimadzu. Seguidamente empezamos a leer de los patrones y las muestra una a una.



Figura 14.- Equipo de espectroscopia UV-VIS Shimadzu 1201. Fuente: Foto tomada por el autor.

Esquema 2.- Proceso analítico empleado para Espectroscopia UV-VIS. Fuente: Autor







A una longitud de onda máxima de 400nm y una longitud de onda mínima de 200nm; procedemos a leer las absorbancias obtenidas

Lectura de las pruebas realizadas a través de Cromatografía de capa fina y Espectroscopia UV visible

Insecticida a evaluar

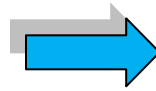
En el estudio se utilizaron 6 muestras, donde se tomaron las que se encontraban en los rangos 269-274-277nm de longitud de onda, obteniéndose el extracto y se procesó.

Una vez transcurrido el tiempo en el tanque, se procedió a examinar la placa, en la cual se considera como positivo una vez revelada la placa, nos encontramos con una serie de manchas circulares. Si la separación ha sido buena cada una de ellas se corresponderá a un único compuesto de la mezcla inicial. Por el contrario la ausencia de manchas circulares se interpreta como negativo.

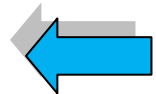
En Espectroscopia UV visible el estudio de los grupos auxocromos y de su influencia en el desplazamiento de ciertos compuestos químicos no están en la región visible por lo tanto las muestras, no coinciden con los valores de referencia en el margen de rango de absorbancia, interpretado como negativo.

1. Recolección del material orgánico.

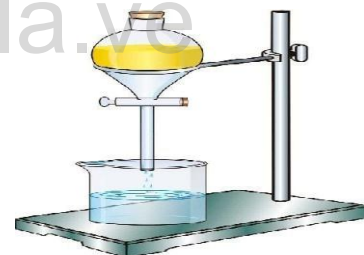
2. Tratamiento



4. Determinación de organofosforados en cromatografía de placa fina.



3. Obtención del extracto con Parathión y Pirynex.



Esquemas 3.- Procedimiento para la obtención de los extractos y evaluación de la presencia de organofosforados. Fuente: Autor.

Diseño de Análisis

El análisis de los datos fue realizado a través de un enfoque cualitativo. Al respecto Taylor y Bogdan, (1984) refirieron el enfoque cualitativo como el estudio de la gente a partir de lo que dicen y hacen las personas en el escenario social y cultural. En este sentido es un método que no se basa en los números.

Los datos cualitativos se analizaron determinando las frecuencias absolutas y relativas (94,4% muestras negativas; 5,6% muestras positivas). El análisis cromatografico se realizaron determinando el factor de resolución se hizo identificando cada una de las manchas de acuerdo con su color y el análisis Espectral se realizo en un instrumento de medición (shimadzu 1201), donde se hizo un barrido espectral de 225 y 350nm y procedimos a leer las absorvancias. Los cromatogramas y espectros se procesaron con el programa Image. Los análisis estadísticos y los gráficos se realizaron con los programas SPSS versión 21.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Las extracciones obtenidas de las muestras de vino, fueron sometidas en primer lugar a las pruebas presuntivas de orientación de Hidrolisis alcalina y Averrell Norrrys; y como segundo punto la aplicación de técnicas analíticas con mayor sensibilidad como son la cromatografía de capa fina y Espectrofotometría UV visible, tomando lectura del factor de resolución en el caso de la cromatografía de capa fina y en la espectroscopia UV-VIS leyendo sus absorbancias, se usaron **Parathión etílico** y **Pyrinex clorpirifos** como compuestos organofosforados de control positivo. La presencia de insecticidas se determinó frente a organofosforados.

Tabla 3. Resultados obtenidos para la Determinación de organofosforados en vinos artesanales. Fuente del autor

	Muestras	Hidrolisis Alcalina	Averell Norriss	Cromatografía Rf	Espetrum UV longitud de onda	Espetrum UV Absorbancia
ControlA	Parathión etílico	Positivo	Positivo	0,68mm	P-272,8 V-234,2 P-212,6	1,579 0,485 1,432
ControlB	Pyrinex clorpirifos	Positivo	Positivo	0,36mm	P-206,4 V-216,6 P-229,0 V-255,6 P-289,6	1,174 0,793 1,096 0,046 0,537

1	UC Vino A	Negativo	Negativo	NA	P-203,6	1,755
2	UC Vino B	Negativo	Negativo	NA	P-200,6	1,600
3	UC Vino C	Negativo	Negativo	NA	P-202,6	1,550
4	Vino PRB A	Negativo	Negativo	NA	P- 278,6 V- 256,4	0,820
5	Vino PRB B	Negativo	Negativo	NA	P- 278,6 V- 256,4	0,829
6	Vino PRB C	Negativo	Negativo	NA	P- 278,6 V- 255,4	0,822
7	Vino M V A	Negativo	Negativo	NA	P-203,2	0,784
8	Vino M V B	Negativo	Negativo	NA	P-203,2	0,800
9	Vino M V C	Negativo	Negativo	NA	P-202,2	0,780
10	Vino MAP A	Negativo	Negativo	NA	P-200,3	0,160
11	Vino MAP B	Negativo	Negativo	NA	P-202,3	0,163
12	Vino MAP C	Negativo	Negativo	NA	P-200,3	0,160
13	Vino NAJ A	Negativo	Negativo	NA	P- 282,4 V- 261,4	0.204

14	Vino NAJ B	Negativo	Negativo	NA	P- 282,4 V- 261,4	0.234
15	Vino NAJ C	Negativo	Negativo	NA	P- 282,4 V- 261,4	0.205
16	Vino D J A	Negativo	Negativo	NA	P-203,4	0,822
17	Vino D J B	Negativo	Negativo	NA	P-203,4	0,900
18	Vino D J C	Negativo	Negativo	NA	P-203,4	0,830
19	Vino RA J A	Negativo	Negativo	NA	P-243,4 V-262,2	0,179
20	Vino RA J B	Negativo	Negativo	NA	P-243,4 V-259,2	0,147
21	Vino RA J C	Negativo	Negativo	NA	P-243,4 V-263,2	0,147
22	Vino MA C A	Positivo	Positivo	0,30	P-210,5	1,422
23	Vino M A C B	Negativo	Negativo	NA	P-243,4 V-263,2	0,830
24	Vino MA C C	Negativo	Negativo	NA	P-243,4 V-263,2	0,830
25	Vino PCV A	Negativo	Negativo	NA	P-307.2	0.354
26	Vino PCV B	Negativo	Negativo	NA	P-307.2	0.354
27	Vino PCV C	Negativo	Negativo	NA	P-307.2	0.349
28	Vino M T A	Negativo	Negativo	NA	P-243,4 V-263,2	0.829

29	Vino M T B	Negativo	Negativo	NA	P-205,2	0,880
30	Vino M T C	Negativo	Negativo	NA	P-205,2	0,880

Tabla 4. Resultados obtenidos sobre los vinos artesanales con el empleo de la Hidrolisis alcalina y Averell Norris. Fuente del autor

	Muestras	Hidrolisis alcalina	Averell Norris
Control A	Parathión etílico	Positivo	Positivo
Control B	Pyrinex clorpirifos	Positivo	Positivo
1	UC Vino A	Negativo	Negativo
2	UC Vino B	Negativo	Negativo
3	UC Vino C	Negativo	Negativo
4	Vino PRB A	Negativo	Negativo
5	Vino PRB B	Negativo	Negativo
6	Vino PRB C	Negativo	Negativo
7	Vino M V A	Negativo	Negativo
8	Vino M V B	Negativo	Negativo
9	Vino M V C	Negativo	Negativo
10	Vino MAP A	Negativo	Negativo
11	Vino MAP B	Negativo	Negativo
12	Vino MAP C	Negativo	Negativo
13	Vino NAJ A	Positivo	Positivo

14	Vino NAJ B	Negativo	Negativo
15	Vino NAJ C	Negativo	Negativo
16	Vino D J A	Negativo	Negativo
17	Vino D J B	Negativo	Negativo
18	Vino D J C	Negativo	Negativo
19	Vino RA J A	Negativo	Negativo
20	Vino RA J B	Negativo	Negativo
21	Vino RA J C	Negativo	Negativo
22	Vino MA C A	Negativo	Negativo
23	Vino M A C B	Negativo	Negativo
24	Vino MA C C	Negativo	Negativo
25	Vino PCV A	Negativo	Negativo
26	Vino PCV B	Negativo	Negativo
27	Vino PCV C	Negativo	Negativo
28	Vino M T A	Negativo	Negativo
29	Vino M T B	Negativo	Negativo
30	Vino M T C	Negativo	Negativo

Tabla 5. Resultados obtenidos sobre los vinos artesanales con el empleo Cromatografía de capa fina. Fuente del autor.

	Muestras	Cromatografía de capa fina RF
Control A	Parathión etílico	0,36cm
Control B	Pyrinex clorpirifos	0,68cm

1	UC Vino A	NA
2	UC Vino B	NA
3	UC Vino C	NA
4	Vino PRB A	NA
5	Vino PRB B	NA
6	Vino PRB C	NA
7	Vino M V A	NA
8	Vino M V B	NA
9	Vino M V C	NA
10	Vino MAP A	NA
11	Vino MAP B	NA
12	Vino MAP C	NA
13	Vino NAJ A	0,30cm
14	Vino NAJ B	NA
15	Vino NAJ C	NA
16	Vino D J A	NA
17	Vino D J B	NA
18	Vino D J C	NA
19	Vino RA J A	NA
20	Vino RA J B	NA
21	Vino RA J C	NA
22	Vino MA C A	NA
23	Vino M A C B	NA
24	Vino MA C C	NA
25	Vino PCV A	NA

26	Vino PCV B	NA
27	Vino PCV C	NA
28	Vino M T A	NA
29	Vino M T B	NA
30	Vino M T C	NA

Tabla 6. Resultados obtenidos sobre los vinos artesanales con el empleo Espectroscopia UV-VIS. Fuente: Autor

	Muestras	Espetrum UV longitud de onda	Espetrum UV Absorbancia
ControlA	Parathión etílico	P-272,8 V-234,2 P-212,6	1,579 0,485 1,432
ControlB	Pyrinex clorpirifos	P-206,4 V-216,6 P-229,0 V-255,6 P-289,6	1,174 0,793 1,096 0,046 0,537
1	UC Vino A	P-203,6	1,755
2	UC Vino B	P-200,6	1,600
3	UC Vino C	P-202,6	1,550

4	Vino PRB A	P- 278,6 V- 256,4	0,820
5	Vino PRB B	P- 278,6 V- 256,4	0,829
6	Vino PRB C	P- 278,6 V- 255,4	0,822
7	Vino M V A	P-203,2	0,784
8	Vino M V B	P-203,2	0,800
9	Vino M V C	P-202,2	0,780
10	Vino MAP A	P-200,3	0,160
11	Vino MAP B	P-202,3	0,163
12	Vino MAP C	P-200,3	0,160
13	Vino NAJ A	P- 282,4 V- 261,4	0,204
14	Vino NAJ B	P- 282,4 V- 261,4	0,234
15	Vino NAJ C	P- 282,4 V- 261,4	0,205
16	Vino D J A	P-203,4	0,822
17	Vino D J B	P-203,4	0,900
18	Vino D J C	P-203,4	0,830
19	Vino RA J A	P-243,4 V-262,2	0,179
20	Vino RA J B	P-243,4 V-259,2	0,147
21	Vino RA J C	P-243,4 V-263,2	0,147
22	Vino MA C A	P-210,5	1,422

23	Vino M A C B	P-243,4 V-263,2	0,830
24	Vino MA C C	P-243,4 V-263,2	0,830
25	Vino PCV A	P-307,2	0.354
26	Vino PCV B	P-307,2	0.354
27	Vino PCV C	P-307,2	0.349
28	Vino M T A	P-243,4 V-263,2	0.829
29	Vino M T B	P-205,2	0,880
30	Vino M T C	P-205,2	0,880

www.bdigital.ula.ve

En las tablas números 3, 4, 5 Y 6 se observan los resultados obtenidos de la determinación de organofosforados tipo Paration y Pynrex, en los cuales se muestran que los extractos orgánicos obtenidos de los distintos vinos artesanales no presentaron la presencia de plaguicidas tipo organofosforados.



Figura 15. La presencia de organofosforados en el extracto se puede observar el crecimiento o recorrido de la placa de cromatografía con Paration y Pyrinex, y la ausencia del recorrido en los pozos de las muestras con el extracto.

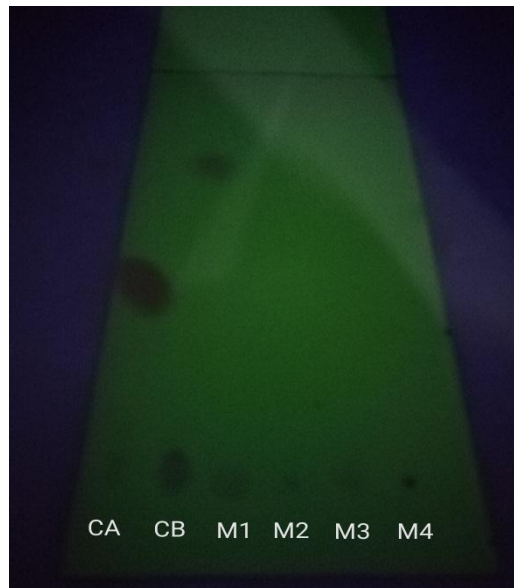


Figura 16. La presencia de organofosforados en el extracto puede observar la mancha en la placa con la lámpara de UV en Paration y Pyrinex, y la ausencia de la mancha en las muestras sospechosas.

Discusión

En esta investigación de campo, descriptiva, confirmatoria y bivariante se pretendió determinar, si hay presencia o no, de plaguicidas tipo organofosforados en vinos artesanales, estudio realizado en el Laboratorio de Toxicología Dr. Pablo Paredes Vivas de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde Enero del 2018 hasta octubre del 2018. El evento de estudio se consideró con la finalidad de analizar diez muestras de vinos artesanales por triplicado, a los cuales se le aplicaron en una primera fase pruebas de orientación: Averell Norris, Hidrólisis alcalina. De las diez, a seis muestras por triplicado, se les aplicó la segunda fase dos pruebas de mayor sensibilidad cromatografía de capa fina y espectroscopia Uv-visible las cuales fueron extraídas con un solvente creciente polaridad (éter petróleo). Las cuales fueron procesadas por medio de métodos convencionales y estandarizados para el aislamiento e identificación de los organofosforados.

Es importante resaltar que de estar presentes los organofosforados, en los vinos artesanales en la presente investigación, tendrían efectos toxicológicos en el organismo de los consumidores de este tipo de producto y así mismo generarían consecuencias tales como reducción de poblaciones vegetales y animales benéficas, habría presencia de plaguicidas persistentes en el agua, en el suelo, en los alimentos y en los organismos vivientes.

En esta investigación los resultados encontrados fueron negativos en contraposición a que en la mayoría de productos denominados vinos comerciales se ha evidenciado ese tipo de elementos tóxicos, destructivos, perjudiciales en la salud de los seres humanos. Así mismo, esta investigación genera confiabilidad a algunas empresas manufactureras de productos artesanales o industriales ya que no contienen ese tipo de elementos tóxicos en sus vinos.

La metodología usada en esta investigación estuvo representada por la recolección de las muestras de vinos en comercios de venta de bebidas artesanales en el Mercado Principal, ubicado en la Parroquia Antonio Spinetti Dini, municipio Libertador del Estado Mérida, los cuales posteriormente fueron destinados al proceso de trasvasado, en recipientes previamente esterilizados y se extrajo con solventes de creciente polaridad para la obtención de los respectivos extractos.

En la comparación de Los extractos con Parathión etílico y Pyrinex clorpirifos con respecto a las muestras de los vinos artesanales, se demostró que elementos toxicológicos existentes en el Parathión y Pyrinex no están presentes en la comprobación de los resultados del estudio sobre las muestras sospechosas, aquí realizado.

Para la realización del presente estudio se utilizó el método de Cromatografía de capa fina, cuyo método consiste en una técnica de separación de sustancias, permitiéndole a la presente investigación que los resultados arrojados sean totalmente comprobablemente negativos. En consecuencia todo este estudio permitió la elaboración de una fórmula química, científica que demostró que se pudo aplicar a este experimento el factor de resolución, el cual consiste en la separación de las drogas y las estándares son visualizadas por medio del uso de luz ultravioleta y luego aplicados reveladores cromatográficos. Las muestras representadas en áreas de color bajo este método, dieron como resultado un diámetro para el Patrón A parathión 0,68mm y para el Patrón B pyrinex 0,36mm. Al comparar Los patrones A y B con las muestras sospechosas se demuestra en el estudio aplicado que no hay presencia de los elementos tóxicos presentes en los patrones como organofosforados de tipo Parathión y Pyrinex.

Así mismo, con el método físico de revelado con la lámpara UV y el revelador cromatográfico, para las muestras de vino, que no hubo recorrido de las muestras sospechosas (M), al compararlos con los patrones (P) lo que expresa que no hay presencia de organofosforados de tipo Parathión y Pyrinex.

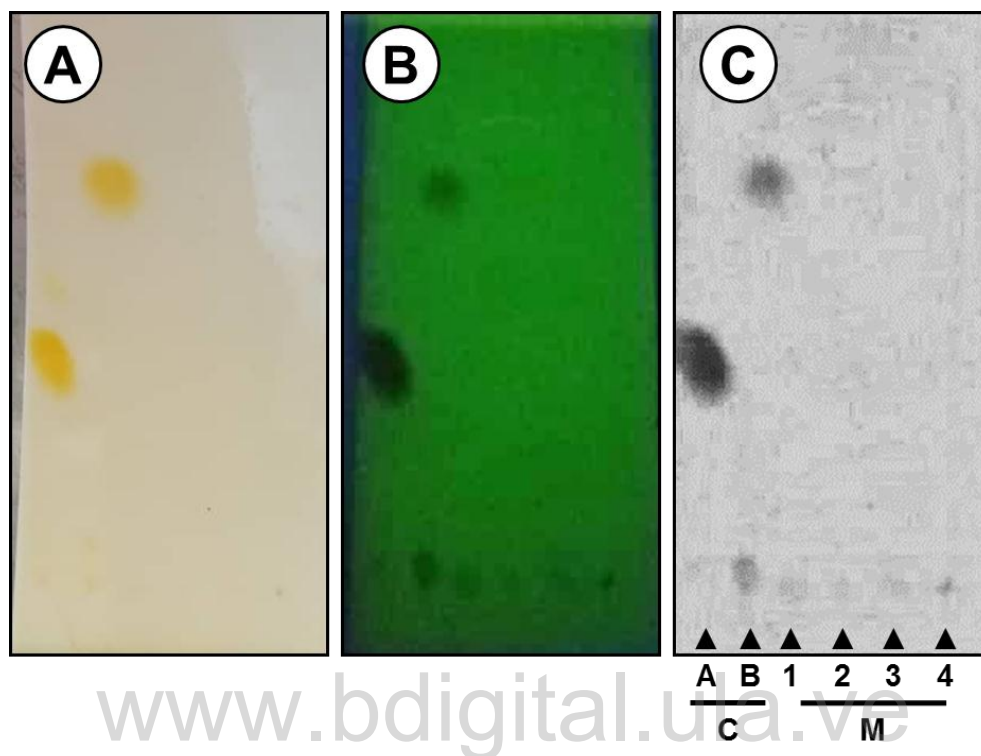


Figura 17. Presencia de organofosforados en muestras sospechosas (M) y patrones de Paration (CA) y Pynrex (CB). Panel A: Recorrido de la placa cromatográfica. Panel B: Placa cromatográfica revelada con la lámpara de UV. Panel C: Digitalización de la placa cromatográfica.

Por otra parte usando el método de Espectroscopia UV visible, técnica basada en el proceso de absorción de la radiación ultravioleta-visible (radiación con longitud de onda comprendida entre los 160 y 780nm. Este análisis se hizo a través de dos enfoques, donde permito el estudio de dichas muestras en un instrumento de medición (shimadzu 1201), el cual fue preparado con anterioridad, donde arrojo para los Patrones Pyrinex clorpirifos (Muestras A y D) y de Parathión etílico (Muestras B y E) la presencia de los grupos auxocromos en la región visible que no absorbe por si solo en la región del ultravioleta tiene el efecto de desplazar los picos, las longitudes onda con los patrones Pyrinex A 220nm y D 200nm y Parathión B 220nm y E 200nm; Al comparar los patrones Parathión y Pyrinex con las muestras de vinos C y F se demuestra en el estudio aplicado que no hay presencia de grupos auxocromos en la región visible, ni en la región ultravioleta la presencia de picos en esta región. Es decir, son dos planos casi semejantes en la observación del estudio en cuestión, sin embargo UV-VIS es el más evidente, es el que permite determinar con mayor certeza los resultados de las muestras.

www.bdigital.ula.ve

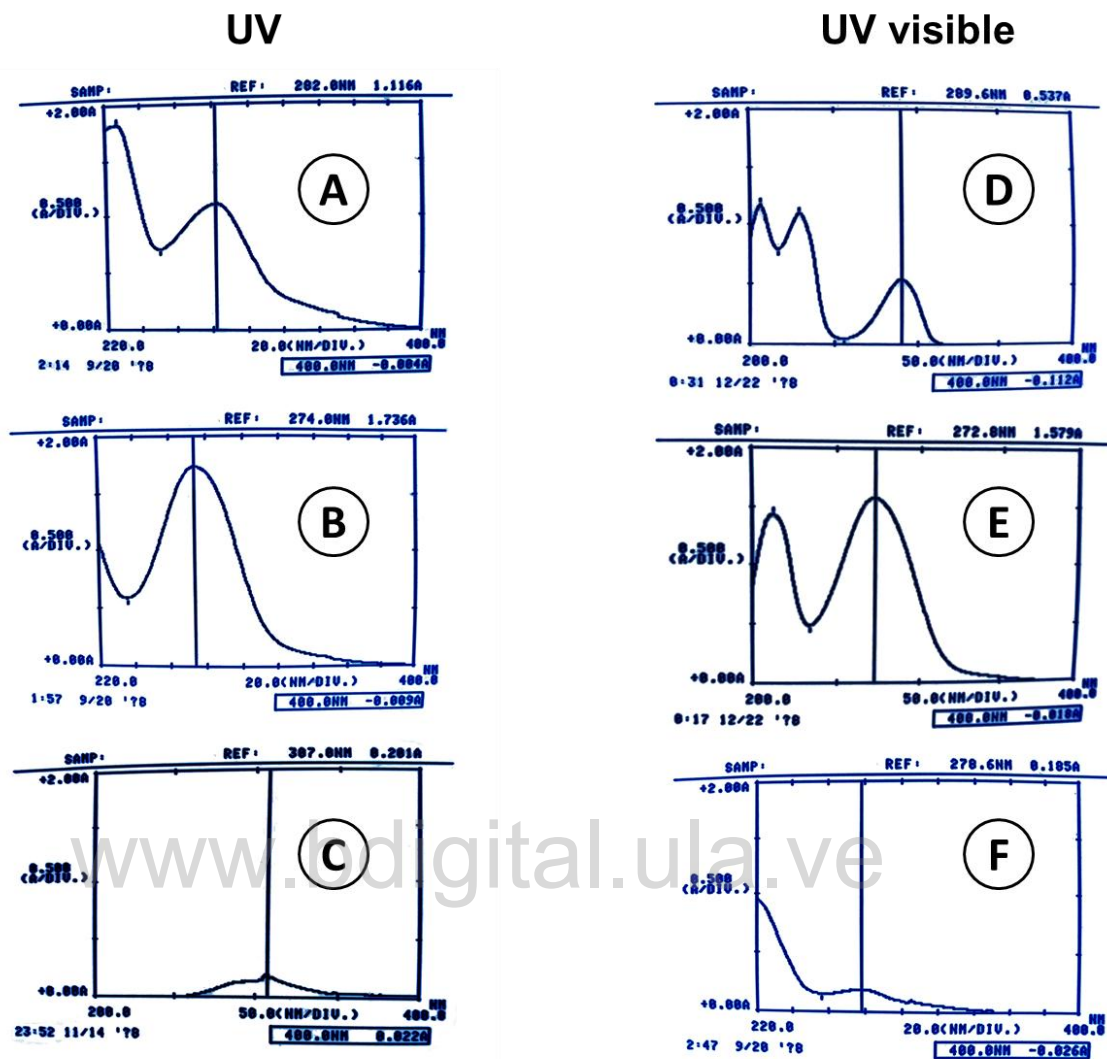


Figura 18. Análisis espectroscópico (UV y UVB visible) de la presencia de organofosforados en muestras sospechosas (C y F) y patrones de Pynrex (A y D) y Parathión (B y E).

Los resultados de estas muestras indican, que una probabilidad del 94% la no existencia de organofosforados en los vinos. En ese mínimo porcentaje positivo, que surge de una muestra del triplicado, se dio un resultado positivo, lo que no es probatorio para todo el resto de las muestras, indicando que hay un margen de error, en ese resultado ocasionado tal vez, por una presunta contaminación de la muestra de ese triplicado.

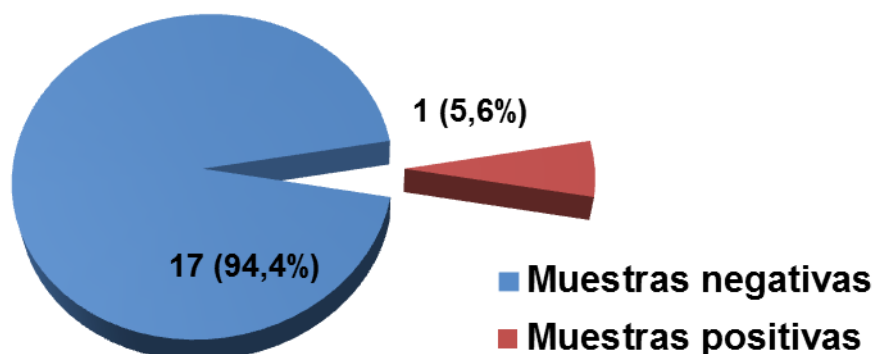


Figura 19. Presencia de organofosforados en muestras sospechosas de vinos artesanales.

www.bdigital.ula.ve

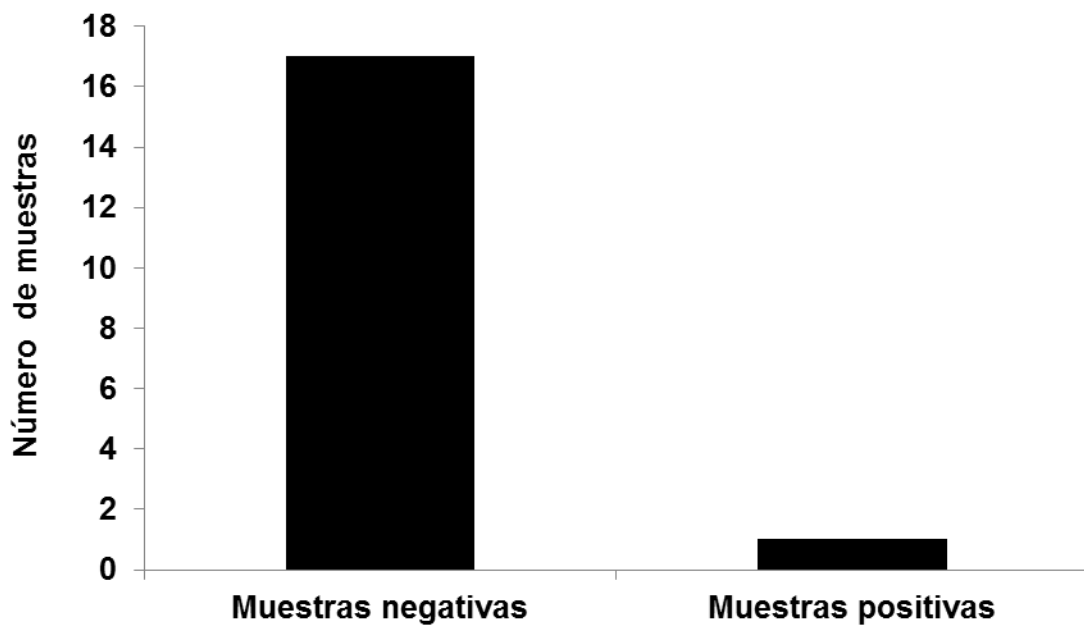


Figura 20. Presencia de organofosforados en muestras sospechosas de vinos artesanales.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

A través del presente estudio se pudo demostrar que al no estar presentes los organofosforados en las muestras analizadas se concluye.

1. En la aplicación de las técnicas usadas, cromatografía de capa fina y espectroscopia UV VIS, durante el presente estudio de comparación de extractos con Parathión etílico y Pyninex clorpirifos con respecto al análisis de seis de las diez muestras de vinos artesanales, se demostró que estos elementos extremadamente toxicológicos existentes en el Parathión y Pyninex no se encuentran presentes durante la comprobación de los resultados del estudio aquí realizado sobre las diez muestras sospechosas de vinos artesanales recolectadas en el mercado principal del estado Mérida.
2. El uso indiscriminado de productos organofosforados han ocasionado daños a la salud de los consumidores, por ser elementos tóxicos, venenosos, contenidos en los plaguicidas tipo organofosforados Parathión y Pyninex.
3. La utilización de este tipo de plaguicidas, genera o afecta la economía de los productores artesanales por ser de alto costo y casi imposible de adquirir en el momento país actual.
4. Se comprobó que la utilización de ese tipo de elementos organofosforados no solo afectan la salud de los seres humanos, sino también destruyen el ambiente, se adhieren a las plantas, envenenan el agua y todo tipo de vegetales.
5. Finalmente es importante promover esta información sobre la producción artesanal de vinos artesanales, sin la presencia de elementos tóxicos como los organofosforados, demostrándose que son productos de altísima calidad, aunque el tema de esta investigación es la comprobación de estos elementos descritos anteriormente en las muestras de vinos artesanales dadas.

Recomendaciones

El estudio realizado en la presente investigación, con respecto a las consecuencias ocasionadas por los elementos tóxicos, organofosforados, presentes en alimentos, vegetales, bebidas, vinos, permite recomendar:

1. Se recomienda continuar con las continuas investigaciones científicas en el área de Bioanálisis, para eliminar el uso de toda esa gama de químicos extremadamente tóxicos, en la agricultura y en la industria de la elaboración de productos artesanales para el uso, consumo y alimentación de la población.
2. La presente investigación también permite recomendar el fortalecimiento de la agricultura artesanal sin el uso de químicos, utilizando métodos de protección diferentes.
3. Se recomienda el asesoramiento permanente de parte de los investigadores y científicos de nuestra Universidad de los Andes, a los productores artesanales de este tipo de bebidas, patentando su calidad y su continua producción.
4. Se recomienda la presente investigación sobre organofosforados extremadamente tóxicos, como aporte en la lucha contra el daño que ocasionan los agro tóxicos en la genética, en la salud y en todo el sistema sanguíneo de la población que consume este tipo de productos contaminados de pesticidas en general, quienes ignoran incluso, de donde proviene el daño ocasionado.

BIBLIOHEMEROGRAFIA

Abbott, D. Andrews, R. (1970). *Introducción a la Cromatografía*, 3a ed., Alhambra, Madrid.

Aguirre, A. (2018). Química educativa. Espectroscopia Uv-Visible (UV-Vis).

Arrebola, F., Martínez, J., González., M. Garrido., A. Sánchez, N. (2003). *Evaluación de la cromatografía multidimensional acoplada con espectrometría de masas en tándem (LC / LC-MS / MS) para el análisis de proteínas a gran escala: el proteoma de levadura. Proteome Res.* 2003 Jan-Feb;2(1):43-50.

Arias. F. (1999). *El proyecto de investigación*. Guía para su elaboración (3ra edición). Editorial Episteme. Caracas-Venezuela. P.30

Arias. F. (2004). *El proyecto de investigación*. Guía para su elaboración (3ra edición). Editorial Episteme. Caracas-Venezuela.

Ávila, Z y Bates, R. (2001). *Experimentos con un enfoque ecológico*. Química orgánica. Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial, UNAM, México.

Barrios, J. (2018). Guía de Laboratorio de Toxicología General de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes. Prof. José Barrios.

Cabras, P., Angioni, A., Garau, VL., Mellis, M., Pirisi, FM., et al. Minelli E.V. (2000). *Residuos de plaguicidas en uvas, vino y sus productos de procesamiento. J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 4, 967-973.

Calabuig, G. (2004). *Medicina Legal y Toxicología*. Editor Enrique Villanueva Cañadas 6ª edición. Barcelona.

Casaverde, M. (2014). *Cromatografía Análisis de alimentos*. Aprobado en Sesión Plenaria de Asamblea Estatutaria de fecha 13 de Octubre del 2014 (Ley N° 30220-Ley Universitaria). Universidad Nacional de Piura. Perú.

Circuitos Agro productivos y Agroalimentarios del Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras. Entrevista personal con Lic. Belkis González.

Consejo nacional de protección del medio ambiente para la salud (CONAPMAS): Manual básico para la prevención de riesgos en el uso de plaguicidas. Lima; 1989.

Clement, B. (2002). *Manual de Prácticas para el Laboratorio de Química Orgánica*. Texas A&M University, USA, 2002.

David L. (1988). Fungicidas. *Mecanismo de acción y resistencia*. Sociedad Americana de Fitopatología.

Del Puerto, A. et al. (2014). *Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud*. *Rev Cubana Hig Epidemiol* [online]. 2014, vol.52, n.3, pp.372-387. ISSN 1561-3003.

Díaz, J. (2016). *El arte de la elaboración del vino artesanal*. Madrid.

Fernández, D., Mancipe, L., y Fernández, D. (2010). *Intoxicación por organofosforados*. *rev.fac.med* vol.18 no.1 Bogotá.

Flint, M y Gouveia, P. (2007). *MIP en la práctica: Principios y métodos de manejo integrado de plagas*. Folleto Espectroscopia Molecular. Espectrofotómetros UV-Visible Thermo Scientific Serie GENESYS 10S.

Frías-García, S., Sánchez, M.J., Rodríguez-Delgado, M.A. (2004). *Optimization of a solid-phase microextraction procedure for the determination of herbicides by micellar electrokinetic chromatography*. *J. Sep. Sci.*, 27, 660.

García, A., Mañes, J., Font, G., Picó, Y. (2004). *Evaluación de la extracción en fase sólida y extracción con sorbete con barra de agitación para la determinación de residuos de fungicida a niveles bajos de microg (µg) (-1) en uvas mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas*. *J Chromatogr A*. 2004 Oct 1;1050(2):119-27.

Henao, H., Samuel, M., Corey, O., Germán J. (1991). *Plaguicidas inhibidores de las colinesterasas*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Programa de Salud Ambiental. México: OPS y OMS; 1991. p. 4-5; 18, 20.

Hernández-Borges, J., Cifuentes, A., García-Montelongo, F.J., Rodríguez-Delgado, M.A. (2005a). *Análisis de plaguicidas en leche de soja combinando extracción en fase sólida y electroforesis capilar-espectrometría de masas*. J Sep Sci. 2005 Jun;28(9-10):948-56.

Hernández-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M.A., García-Montelongo, F.J., Cifuentes, A. (2004b). *Análisis de plaguicidas por electroforesis capilar*. Electrophoresis, **25**, 2065.

Hesse, S. (2012). Object oriented oil spill contamination mapping in west. Siberia with Quickbird. Department of Earth Observation, Löbdergraben 32, 07743 Jena.

Hernández, R., Fernández C. y Baptista, P. (2010). *Metodología de la Investigación*. 3° edición. Colombia: Editorial McGraw Hill.

Hurtado J. (2010). *El “para qué”, o los objetivos de la Investigación*. En: el proyecto de investigación. Comprensión holística de la Metodología y la Investigación 6ta. Ed. Caracas , Bogotá: Ediciones Quirón. pp. 89-95

Icen, E., Armutçu, F., Büyükgüzel, K., Gürel, A., (2005). *Indicadores bioquímicos de estrés de mayor exposición de polilla de cera a insecticidas organofosforados*. J Econ Entomol. Abril de 2005; 98 (2): 358-66.

Juan, A y Pico, G. (2003). *Revisión de los Métodos de determinación de residuos de plaguicidas órgano fosforado en alimentos*. Revista toxicología. Pamplona, España. Vol. 20, número 003 ,p 166-175.

Juarez, M. (2009). *Actualización de la base de datos de plaguicidas*. INE-ADA-011/2004. Extraído desde la fuente: delINE:<http://www.ine.gob.mx/dgicur/sqre/descargas/informe%20bdatos%20plaguicidas%20final.pdf>.

Lara, G. (2013). *Plaguicidas en la biodiversidad del suelo; su comportamiento como contaminantes*. España: Biociencias.org y Biociencias.com; c2001-2013 [citado 19 junio 2013]. Disponible en: <http://www.biociencias.org/odisea/plaguicidas>

Lilia, A. (1997). *Plaguicidas en introducción a la toxicología ambiental*. México: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. División de Salud y Ambiente. p.366-70; 371-76.

Molina-Mayo, C., Hernández-Borges, J., Borges-Miquel, T.M., Rodríguez-Delgado, M.A. (2007). *Determinación de pesticidas en vino mediante cromatografía micelar electrocinética con detección UV y apilamiento de muestras*. J Chromatogr A. 2007 May 25;1150(1-2):348-55. Epub 2006 Jul 7.

Morales, A. (2018). Análisis Instrumental. Facultad de farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes. Prof de análisis.

Navarro, S., Barba, A., Oliva, J., Navarro, G., Pardo, F. (1999). *Evolución de los niveles residuales de seis plaguicidas durante la elaboración de vinos tintos*. Efecto de los procedimientos de vinificación en su desaparición. J Agric Food Chem. 1999 Jan;47(1):264-70.

Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jiménez, J.J., Martín, M.T., Bernal, J. (2005). *Determinación de fungicidas azólicos en vino mediante extracción en fase sólida y cromatografía líquida de alto rendimiento, presión atmosférica, ionización química, espectrometría de masas*. J Chromatogr A. 2005 May 27;1076(1-2):90-6.

Organización Mundial de la Salud. (2018). La resistencia a los antibióticos es hoy una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo.

Organización Mundial de la salud. (2018). Residuos de plaguicidas en los alimentos.

Ortinez, O., Ize, I., Gavilan A. (2003). *La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos*. Gaceta Ecológica, numero 069. Instituto Nacional de Ecología. México, D.F.. p. 83-92.

Oliva, J., García, M.A., Navarro, S., Pardo, F., Barba, A., (2001). *Efecto de los residuos de fungicidas en el contenido de ácidos orgánicos en vinos blancos*. Tecnología, ISSN 1578-6153, N°. 34, 2006, págs. 74-7.

Parella, S., Martins, F. (2006). *Metodología de la investigación*. 2^a.ed. Caracas; Venezuela.

Pazmiño, A y Aguiar, M. (2008). Proyecto de elaboración artesanal y comercialización del vino de naranja San Marcos de Guayaquil. Ecuador.

Pitarch, E. (2001). *Desarrollo de metodología analítica para la determinación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en muestras biológicas humanas*. Tesis Doctoral. Castellón de la Plana, Castellón, España.

Quitoquímica del 2009 “biotecnológica que está en la constante búsqueda y desarrollo de nuevos productos e insumos 100% ecológicos, de origen natural y biodegradable”.

Ravelo, L. (2009). *Metodologías analíticas alternativas para la determinación de plaguicidas en aguas y productos agroalimentarios* (tesis de doctoral).

Repetto, M. (1997). *Toxicología fundamental*. 3ra ed. Madrid: Ediciones Díaz y Santos; 1997. p.280.

Reséndez, H. (2009). *Análisis hiperespectral de suelos contaminados por hidrocarburos y pesticida* (Tesis de post-grado). Monterrey, México.

Reseña Toxicológica del Parathión del 2017 producida por la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, Servicio de Salud Pública, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública en Atlanta, GA.

Rial-Otero, R., Yagüe-Ruiz, C., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J. (2002). J. Chromatogr. A, 942, 41.

Roberto, R. (2018). *Análisis instrumental*. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Rodríguez, A., Suárez, S., Palacio, D. (2014). *Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud*. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, vol. 52, núm. 3, septiembre-diciembre, 2014, pp. 372-387

Rouessac, F y Rouessac, A. (2003). “*Análisis químicos y técnicas instrumentales modernas*”. Ed. Mc Graw Hill.

Sabino, C. (19886). *Investigación descriptiva*. El proceso de Investigación. Ed. Panapo, Caracas, 1992, 216 págs.

Salazar, G. (2018). *Espectroscopia de absorción molecular*. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes.

Salazar, J. (2008). *Espectroscopia de absorción molecular*. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Saval, S.(2012). *La reparación del daño*. Aspectos técnicos: Remediación y restauración. Extraído el 25 de octubre del 2012 desde la fuente:
<http://info5.juridicas.unam.mx/libros/1/141/9.pdf>.

Schellin M, Hauser B, Popp P. J. Chromatogr A. 2004. 1040, 251.

Skoog, D., Leary, J., Holler, F. (1998). *Principios de análisis instrumental*. 5° ed.; Ed. McGraw-Hill (1998), págs. 353-367.

Tamayo, T. M. (1998). *El Proceso de la Investigación Científica*. México: Ediciones Lumusa. S.A.

Tamayo, T. M. (1998). *El Proceso de la Investigación Científica*. México: Ediciones Lumusa. S.A.

Taylor, S. y Bogdan, R. (1984). *Introducción a los Métodos Cualitativos de Investigación*. Ediciones. Paidós. Primera edición: 1984. Segunda edición: 1987. Tercera edición: 2000.

Taylor, S. y Bogdan, R. (1990). *Introducción a los métodos cualitativos de investigación*. Barcelona: Paidós.

Tigrino, E. (2012). Seminario de enología. 2º cuatrimestre.

Villa, M. (2012). *Determinación de Acetilcolinesterasa y algunos Parámetros Hematológicos en trabajadores expuestos ocupacionalmente Agroquímicos en el Estado Mérida después de una jornada de trabajo* (Tesis de pre-grado). Mérida, Venezuela: Universidad de los Andes, Escuela de Bioanálisis.

Yané, C. (2008). *Manual de Cromatografía de capa fina*. Facultad de farmacia de la Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.

Zamora, Z. (2004). *Determinación de residuos de fungicidas en productos vegetales mediante técnicas cromatográficas avanzadas* (tesis de post-grado). Ecuador. Disponible en: E:\TESIS\Determinación de residuos.