

Optimización y validación de un método de dispersión de matriz en fase sólida para la extracción de plaguicidas organofosforados en hortalizas.

A.I. Valenzuela-Quintanar, R. Armenta-Corral, E. Moreno-Villa, L. Gutiérrez-Coronado, P. Grajeda-Cota y C. Orantes-Arenas.

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Carretera a la Victoria Km. 0,6, Apdo. Postal 1735. Hermosillo, Sonora, México, 83000.

Resumen

Se optimizó y validó el método de dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) para la extracción de plaguicidas organofosforados en hortalizas. Los análisis de plaguicidas se realizaron por cromatografía de gases con un detector fotométrico de flama (FPD) y columna capilar DB-5 la eficiencia de la extracción. En las hortalizas (chile verde, tomate bola, tomate saladette, cebolla, calabacita y brócoli) se evaluó calculando los porcentajes de recuperación. Para ello se adicionó una mezcla de los plaguicidas (diazinón, di-systón, metilparatión, malatión, paratión y etión) Se optimizaron las fases de extracción y purificación, donde 0,5 g de sílice como fase de extracción y 2 g de mezcla de carbón-óxido de magnesio-celite (1:2:4) como fase de purificación, produjeron los mayores porcentajes de recuperación de los plaguicidas (61-108%) eluidos con 40 mL de diclorometano, volumen 95% menor al utilizado en el Método Oficial. Los coeficientes de regresión de las curvas de calibración fueron de 0,99 excepto para etión ($r = 0,98$), los cuales se evaluaron en un intervalo de concentraciones de 50, 100 y 200% de los límites máximos de residuos (LMR). Esta técnica fue aplicada en el análisis de 32 muestras de hortalizas obtenidas de dos centros comerciales locales. Únicamente una muestra de tomate bola presentó niveles de malatión (0,08 $\mu\text{g/g}$) y paratión (0,06 $\mu\text{g/g}$), valores por debajo de los LMR. El método de DMFS optimizado y validado en el presente trabajo resultó ser reproducible, exacto y económico-ecológico por su consumo mínimo de disolventes, y pudiera ser utilizado en análisis rutinarios de plaguicidas organofosforados en hortalizas.

Palabras clave: DMFS, plaguicidas, hortalizas, métodos de extracción.

Introducción

La estabilidad ambiental a nivel mundial está en constante peligro por los efectos naturales y a los provocados por el hombre en su búsqueda de satisfactores alimentarios. Lo anterior ha conllevado a un incremento en la producción agrícola y a la aplicación de agroquímicos sintéticos como los plaguicidas organofosforados utilizados en hortalizas (10). Los plaguicidas han propiciado en parte el desequilibrio ambiental, así como su residualidad en alimentos que puede ocasionar problemas a la salud (19); además, el mercado internacional limita a los países exportadores de productos agrícolas por los controles solicitados por los importadores (4). Lo que ha propiciado el desarrollo de métodos analíticos rápidos, efi-

cientos, económicos y con menor efecto ambiental por el bajo consumo de disolventes orgánicos, que permitan el constante monitoreo de residuos de plaguicidas en alimentos (10). El método de extracción por Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) cuenta con estas características y puede ser aplicado a una gran diversidad de matrices: tejido animal (9), tejido vegetal (18), leche (8), agua (7), por lo que es un método recomendable para hortalizas. El objetivo del presente trabajo fue optimizar y validar el método de extracción de plaguicidas organofosforados por dispersión de matriz en fase sólida en hortalizas de alto consumo en la región Noroeste de México, una de las principales zonas exportadoras a nivel nacional.

Materiales y métodos

Soluciones de trabajo de plaguicidas

Los plaguicidas estudiados fueron diazinón, di-systón, metilparatión, malatión, paratión y etión (Polyscience, IL., USA) seleccionados por su uso en el cultivo de frutas y hortalizas (2). Se prepararon las soluciones patrón de cada plaguicida, y a partir de éstas, las soluciones de trabajo a tres niveles de concentración de 50, 100 y 200% del límite máximo de residuos (LMR) para tomate, establecidos por USDA, 1991 (16) para etión, paratión y diazinón; por el Codex Alimentarius, 2005 (3) para di-systón y malatión, y por CICOPLAFEST, 1997 (2) para metilparatión. Se citaron diversas

fuentes para cubrir los plaguicidas analizados, ya que para algunos de ellos, dependiendo de la fuente no está aprobado su uso. Estos valores fueron modificados en el Laboratorio de Residuos Tóxicos (LRT), aprobado por SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) y acreditado por EMA (Entidad Mexicana de Acreditación), tomando en cuenta la resolución de la columna para un tamaño de muestra de 0,5 g utilizados por el micro-método de extracción DMFS, en comparación a 25 g de muestra que establece el método oficial (cuadro 1).

Cromatógrafo de gases

Se utilizó un cromatógrafo de

Cuadro 1. Composición y concentración de la solución de trabajo empleada en el análisis de plaguicidas organofosforados, límites máximos de residuos (LMR) y límites mínimos de detección (LMD).

Plaguicidas Organofosforados	Solución patrón mg/mL	Volumen ^a mL	Solución de trabajo ^b µg/g	LMR ^c µg/g	LMD ^d µg/mL	LMD ^e µg/mL
Diazinón	169	1,479	2,0*	0,5 ¹	0.005	0.005
Disystón	458	0,546	2,0*	0,5 ²	0.006	0.006
Metilparatión	980	0,128	1,0	1,0 ³	0.003	0.003
Malatión	990	0,253	2,0*	3,0 ²	0.008	0.008
Paratión	980	0,128	1,0	1,0 ¹	0.002	0.008
Etión	950	0,263	2,0	2,0 ^{1,2,3}	0.003	0.002

^aEl aforo se realizó con diclorometano grado plaguicida a un volumen de 25 mL

^bSolución de trabajo con LMR ajustados (*)

^cLMR = Límite Máximo de Residuos

¹USDA, 1991

²Codex Alimentarius, 2005

³CICOPLAFEST, 1997 (Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas)

^dLMD = Límites mínimos de detección establecidos en el Laboratorio de Residuos Tóxicos del CIAD (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo) acreditado por SAGARPA

^eLMD = Límites mínimos de detección con el método de la NOM-028-ZOO-1994

gases Varian Modelo 3300 con un detector fotométrico de flama (FPD) y una columna megaboro J&W Scientific DB-5 (30m x 0,53 mm DI, 1,5 µm). Las condiciones de separación de los plaguicidas fueron: Temperatura inicial de 190°C por 1 minuto, a una velocidad de calentamiento de 3°C/min hasta alcanzar 275°C, la cual se mantuvo por 10 min; el flujo del gas acarreador (nitrógeno) fue de 30 mL/min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 220°C, con un flujo de hidrógeno de 140 mL/min y flujos de aire de 80 y 170 mL/min; condiciones cromatográficas establecidas en el LRT del CIAD. Los límites mínimos de detección establecidos en el LRT del CIAD se mues-

tran en el cuadro 1, para lo cual se hicieron diluciones a partir de las soluciones del 50% del LMR de cada plaguicida, determinando así la sensibilidad del equipo.

Selección y preparación de la muestra

Se seleccionaron cinco hortalizas de alto consumo en el Estado de Sonora (17): tomate bola (*Lycopersicon esculentum*), tomate saladette (*Lycopersicon esculentum*), calabaza italiana (*Cucurbita pepo*), chile verde (*Capsicum annum*) y cebolla blanca (*Allium cepa*), además se incluyó al brócoli (*Brassica oleracea*) por su alto contenido de selenio y su actividad anticancerígena (5). Se muestrearon al azar 10 g de cada hortaliza en dos

centros comerciales de la localidad, obteniéndose un total de 32 muestras. Las hortalizas se lavaron, se homogeneizaron en una licuadora Molinex tipo 648, se empacaron en bolsas de plástico en porciones de 200 g, se etiquetaron y se almacenaron a -20°C hasta su análisis. No fue necesario secar las muestras ya que en base a la metodología de la Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994, todo el proceso se realiza en base húmeda incluyendo los controles (11).

Aseguramiento de la calidad de los datos

En todos los análisis realizados durante la optimización y validación del método, se incluyó una muestra blanco o control negativo (tejido libre de plaguicidas), una muestra adicional o control positivo (tejido blanco adicionado con la solución de trabajo al 100% de los LMR), un blanco reactivo y la solución de trabajo al 100% de los LMR.

Optimización

Método de extracción y de purificación

Se utilizaron diferentes fases sólidas de extracción y purificación como sílice, (60 μm tamaño de poro, Baxter, USA), alúmina, octadecilsilano (C-18) y una mezcla de adsorbentes, la cual contiene carbón activado, óxido de magnesio y celite en proporciones 1:2:4 respectivamente, preparada de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-028-ZOO, (12). Se homogeneizaron en un mortero 0,5 g de la fase de extracción con 0,5 g de cada hortaliza adicionada con 100 μL de la solución de trabajo de plaguicidas, correspondiente al 100% de los LMR (mezcla homogénea). La mez-

cla homogénea se empacó en jeringas de vidrio ó plástico de 5 y 10 mL respectivamente, previamente empacadas con la fase de purificación. La elución se probó con diferentes volúmenes (15, 20, 40, 60 mL) de hexano o diclorometano grado plaguicida, para determinar el volumen y el disolvente de elución con los que se obtuvieran mayores porcentajes de recuperación. El eluyente se recolectó en un tubo de ensayo de 50 mL y se evaporó hasta sequedad en un evaporador de aire (Organomation Associates, Inc. Berlin, MA. 01503, USA) a 40°C .

Análisis cromatográfico de plaguicidas

El extracto evaporado se reconstituyó con 100 μL de diclorometano y se inyectaron 2 μL en el cromatógrafo de gases. Los porcentajes de recuperación se obtuvieron mediante el método de estándar externo propuesto por Hammarstrand, 1976 (7), en el que se comparan los tiempos de retención y las áreas obtenidas del cromatograma resultante de la solución de trabajo, con los tiempos de retención y las áreas de cada plaguicida obtenidos en la muestra adicionada con las concentraciones conocidas de los analitos de interés. El análisis de las muestras problema se hizo por triplicado de extracción y una inyección de cada extracción.

Validación del método de extracción

Calibración del equipo. Se establecieron las condiciones cromatográficas del equipo y los tiempos de retención de los analitos, así como los límites de detección para cada plaguicida estándar (figura 1).

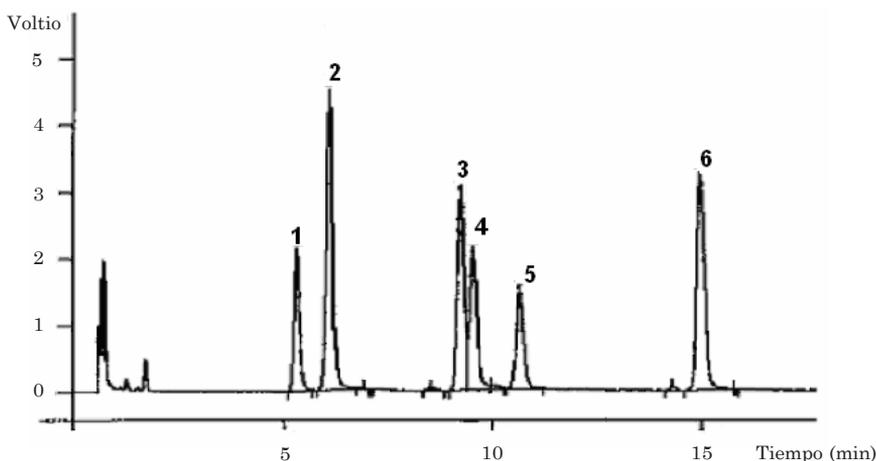


Figura 1. Cromatograma típico de la solución de trabajo al 100% de los Límites máximos de residuos de los plaguicidas organofosforados. (1) Diazinón tiempo de retención, $t_r = 5.321$ min, (2) Disyston $t_r = 6.110$ min, (3) Metilparatión $t_r = 9.219$ min, (4) Malatión $t_r = 9.525$ min, (5) Paratión $t_r = 10.632$ min, (6) Etión $t_r = 14.991$ min.

Fase I. Linealidad del sistema.

En esta fase se evaluó la linealidad del método, la cual está demostrada a través de curvas de calibración, en base al patrón de referencia.

Preparación de soluciones de trabajo de plaguicidas. Se prepararon soluciones de trabajo de cada analito en tres niveles de concentración 50, 100 y 200% del LMR. Esto se realizó durante tres días y cada triplicado de determinación, se inyectó por triplicado en el cromatógrafo. De los cromatogramas se obtuvieron los gráficos de concentración, área y el coeficiente de correlación.

Fase II. Precisión del método (Repetibilidad)

a. Considerando que el método de extracción fue similar para las seis

hortalizas de estudio, se seleccionó una muestra de tomate como tejido blanco. Esta muestra fue analizada previamente y se encontró libre de plaguicidas, por lo que se utilizó para determinar la precisión del método.

b. El tejido blanco se adicionó con las soluciones de trabajo de los plaguicidas con niveles de 50, 100 y 200% del LMR. Los análisis se realizaron durante tres días y cada determinación se realizó por triplicado de extracción con una inyección en el cromatógrafo de cada extracción. Con los resultados de los análisis se calcularon los porcentajes de recuperación y los coeficientes de variación para cada analito y se compararon con los parámetros establecidos por USDA, 1991 (15).

Fase III.- Exactitud del método

En esta etapa se evaluó la exac-

titud del método mediante el análisis de muestras de verificación. El Coordinador de aseguramiento de la calidad del LRT preparó dichas muestras, estableciendo los niveles de adición de los analitos. Se obtuvieron las concentraciones y los porcentajes de recuperación, para posteriormente comparar las concentraciones obtenidas con las concentraciones teóricas establecidas.

Análisis estadístico

Resultados y discusión

Optimización

Durante la optimización del método de DMFS, se trabajaron los siguientes parámetros analíticos: fase de extracción, fase de purificación, tipo de columna cromatográfica, volúmenes y disolventes de elución (cuadro 2). En este cuadro se observan los resultados más relevantes de las modificaciones de los parámetros de extracción realizados, en donde las mayores recuperaciones se obtuvieron con los siguientes parámetros: 0,5 g de sílice para la extracción, 0,5 g de la mezcla de adsorbentes (carbón activado, óxido de magnesio y celite 1:2:4) para la purificación, jeringa de vidrio de 5 mL como columna cromatográfica y 40 mL de diclorometano como eluyente. Estas condiciones de extracción fueron seleccionadas considerando que el extracto obtenido mostró menor interferencia y color. La optimización se realizó con tomate y posteriormente se probó con el resto de las hortalizas (cuadro 3), en las cuales se obtuvieron también altos porcentajes de recuperación.

El método de DMFS propuesto en el presente estudio, promovió una

Los datos obtenidos durante la optimización y validación del método fueron analizados con estadística descriptiva considerando la media, desviación estándar, coeficiente de variación, coeficiente de correlación de las curvas de calibración de cada plaguicida y se realizó un análisis de varianza con la prueba Z ($P < 0,05$) en la linealidad del sistema y en la precisión (repetibilidad) del método.

disminución considerable en el consumo de disolventes, obteniéndose una reducción del 95% en el consumo de diclorometano con respecto al método oficial (13), mientras que otros métodos solo disminuyeron del 31% (10) al 81% (12), a excepción del método propuesto por Anastassiades y col. (1), que logró una disminución del 98%. Sin embargo, este método tiene un incremento en el costo de operación que repercute en el costo de análisis, ya que hace uso de equipos como centrifugas refrigeradas, agitadores, evaporadores, entre otros, lo que no se requiere en el método de DMFS propuesto. Los porcentajes de recuperación obtenidos estuvieron en el rango del 61 al 108%, con coeficientes de variación menores al 8,7%, los cuales están dentro de los parámetros establecidos por USDA, 1991 (15), asegurando que el método de DMFS es adecuado para su aplicación (cuadro 3).

Validación del método

Fase I.- Linealidad del sistema

Los coeficientes de correlación obtenidos fueron de 0,99 para todos los plaguicidas excepto para el etión

Cuadro 2. Optimización de los parámetros del método de extracción y purificación de residuos de plaguicidas en hortalizas por dispersión de matriz en fase sólida.

Fase de extracción g	Fase de purificación g	Disolvente de elución mL	Muestra g	Columna cromatográfica DI/ L mm	Porcentaje de recuperación %
Hexano					
0,2 MA	0,5 A	15	0,1	5/110	40-82
0,2 MA	0,5 A	30	0,5	5/110	55-93
0,1 A	0,1 S	40	0,1	5/110	45-79
Diclorometano					
0,5 C-18	0,5 S	30	0,5	15/75	51-86
0,5 MA	0,5 C-18	30	0,5	15/75	45-90
0,5 MA	0,5 MA	40	0,5	20/95	53- 93
0,5 S	0,5 MA	20	0,5	15/75	49-89
0,5 S	0,5 MA	30	0,5	15/75	58-101
0,5 S	0,5 MA	40	0,5	15/75	65-110

MA = Mezcla de adsorbentes (carbón activado-óxido de manganeso-celite 1:2:4)

C-18 = octadecilsilano

S = sílice

A = alúmina

Cuadro 3. Porcentajes de recuperación y coeficientes de variación de plaguicidas organofosforados en hortalizas mediante el método optimizado de DMFS.

Plaguicidas	Tomate bola		Tomate saladette		Cebolla		Brócoli		Calabaza		Chile verde	
	%	CV	%	CV	%	CV	%	CV	%	CV	%	CV
Diazinón	94	3.8	98	7.5	99	3.1	98	8.7	96	6.9	95	4.6
Disystón	64	5.9	61	2.8	61	1.6	61	1.9	62	4.3	62	2.5
Metil paratión	97	2.1	100	4.4	92	3.8	98	4.1	94	4.3	105	0.6
Malatión	102	4.4	104	7.8	108	2.5	105	3.6	104	3.1	103	1.5
Paratión	101	7.0	97	2.6	101	5.6	98	3.3	100	3.1	103	1.5
Etión	94	0.6	98	6.0	99	7.6	92	3.6	94	2.1	102	8.0

Los valores de los porcentajes de recuperación y coeficiente de variación, corresponden a un promedio del triplicado de extracción y una determinación por extracción.

que fue de 0,98, lo que indica que el sistema conserva la linealidad esperada. De igual forma, los coeficientes de variación estuvieron dentro del valor establecido en las especificaciones. El análisis de varianza mostró que no se presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las repeticiones realizadas cada día, durante los tres días, para cada concentración y en cada plaguicida, lo que indica que se mantuvo la linealidad en el sistema de análisis.

Fase II.- Precisión del método (Repetibilidad)

El parámetro de precisión se evaluó obteniendo los porcentajes de recuperación y coeficientes de variación. Los porcentajes de recuperación obtenidos en los tres niveles de concentraciones de los plaguicidas analizados, estuvieron en un rango de 65 al 102% con coeficientes de variación

menores al 12,4% (cuadro 4), lo que muestra que el método propuesto cumple con las especificaciones y puede ser aplicado con alta seguridad y eficiencia. El análisis de varianza indicó que no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) con lo que se mantuvo la precisión del método.

Fase III.- Exactitud del método

Los resultados de exactitud se muestran en el cuadro 5. En esta etapa se analizaron cuatro muestras por duplicado, adicionadas con concentraciones conocidas de los patrones de plaguicidas. Las concentraciones obtenidas para cada analito fueron adecuadas y estuvieron en un rango del 89 al 111%. Estos valores se encuentran dentro de los parámetros establecidos por USDA, 1991 (15) por lo que el método propuesto muestra la exactitud necesaria para considerar-

Cuadro 4. Porcentajes de recuperación de plaguicidas organofosforados en muestras de tomate fortificadas al 50, 100 y 200% del Límite Máximo Permitido (Fase II. Repetibilidad del método).

Plaguicidas	Recuperación			CV ^a			Especificación ^b	
	50	100	200	50	100	200	Recuperación %	CV ^a %
Diazinón	92	89	89	10,7	12,4	12,1	60-100	≤20
Di-systón	65	68	65	7,3	7,4	7,1	60-110	≤20
Metilparatión	96	99	92	8,6	5,6	10,1	70-110	≤20
Malatión	97	98	93	9,5	6,7	8,0	70-110	≤20
Paratión	101	102	95	7,9	5,2	7,6	65-110	≤20
Etión	92	98	100	8,1	7,9	6,6	65-110	≤20

^aCoefficientes de Variación

^bUSDA, 1991

Cuadro 5. Recuperaciones obtenidas en muestras de tomate contaminadas con diferentes concentraciones de plaguicidas organofosforados (Fase III. Exactitud del método).

Plaguicida	Concentración teórica del compuesto $\mu\text{g/g}$	Concentración obtenida por el analista $\mu\text{g/g}$ + DE	CV %	Porcentaje de recuperación obtenido por el analista %	Porcentaje de adecuación ^a %	Porcentajes de recuperación y adecuación aceptados %
Metil-Paratión ¹	1.00	1.03 + 0.034	3.30	95	103	70-110
Etión	1.98	1.97 + 0.1	5.11	92	99	60-110
Dysistón ²	4.02	4.08 + 0.11	2.69	70	102	65-110
Paratión	1.99	2.21 + 0.055	2.49	90	111	65-110
Diazinón ³	1.00	0.89 + 0.01	1.12	80	89	60-110
Malatión	0.99	1.046 + 0.15	0.11	99	105	70-110
NA ⁴	ND	ND	NN	NN	NN	NN

^aRelación entre la concentración teórica y la concentración obtenida, expresada en porcentaje

CV = Coeficiente de variación, DE = Desviación estándar, NA = No adicionado, ND = No detectado y NN = No necesario.

¹Muestra adicionada al 100% LMR con los plaguicidas (Metil paratión y Etión).

²Muestra adicionada al 200% del LMR con los plaguicidas (Dy-sistón y Paratión).

³Muestra adicionada al 50% LMR con los plaguicidas (Diazinón y Malatión)

⁴Muestra sin adición de plaguicidas.

lo como un método adecuado para su aplicación.

Análisis de hortalizas

Una vez validado el método se procedió al análisis de las muestras de hortalizas adquiridas en el comercio local. Del total de las muestras

analizadas solo una de tomate bola presentó 0,06 µg/g de malatión y 0,08 µg/g de paratión, valores menores a los LMR (cuadro 1) y similares a los encontrados por Pérez *et al.*, 2002 (14) por lo que su consumo no representan un riesgo para la salud.

Conclusiones

El método de Dispersión de Matriz en Fase Sólida propuesto en este estudio, que utiliza sílice como fase de extracción y una mezcla de carbón activado, óxido de magnesio y celite como fase de purificación, fue optimizado y validado cumpliendo con los parámetros de calidad especificados por y USDA, 1991 (15). Este mé-

todo, al promover una disminución en el consumo de disolventes, provoca una menor contaminación ambiental, y por ser sencillo y económico, puede ser aplicado como una técnica de análisis de rutina en el monitoreo de hortalizas de consumo nacional y de exportación.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento del proyecto No. 37295 y a la Q.B. María Eugenia Flores

Mungía, Coordinadora de Aseguramiento de la Calidad del Laboratorio de Residuos Tóxicos, por la asesoría en la validación del método de DMFS.

Literatura citada

1. Anastassiades, M. y S.J. Lehotay. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and «dispersive solid-phase extraction» for the determination of pesticides residues in produce. *J.AOAC Int.* 86(2):412-431.
2. Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas CICOPAFEST. 1997. Catálogo Oficial de Plaguicidas. México, D.F.
3. Codex Alimentarius. 2005. FAO/WHO. Roma Italia.
4. FAO. 2002. Informe del taller nacional sobre formación de capacitadores en buenas prácticas agrícolas. Proyecto TCP/RLA/0065. Fortalecimiento de los comités nacionales del Codex y aplicación de las normas del Codex Alimentarius. Cd. Guatemala.
5. Finley, J.W., C. Ip, D. J. Lisk, C.D. Davis, K.J. Hintze y P.D. Whanger. 2001. Cancer-protective properties of high-selenium broccoli. *J. Agric. Food Chem.* 49:2679-2683.
6. Font, G., J. Mañes, J.C. Moltó y Y. Picó. 1993. Solid-phase extraction in multiresidue pesticide analysis of water. *J. Chromatographia*, 642:135-139.

7. Hammarstrand, K., 1976. Gas chromatographic analysis of pesticide. Varian, C.A.USA, 31-53.
8. Long, A.R., L.C. Hsieh, M.S. Malbrough, C.R. Short y S.A. Barker. 1990. Method for the isolation and liquid chromatographic determination of furazolidone in milk. *J. Agric. Food Chem.*, 38:430-432.
9. Long, A.R., M.D. Crouch y S.A. Barker. 1991. Multiresidue matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and gas chromatographic screening of nine chlorinated pesticides in catfish (*Ictalurus punctatus*) muscle tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74(4):667-70.
10. Nakamura, Y., Y. Ronoai, Y. Sekiguchi, Y. Tsumura y N. Nishida. 1994. Multiresidue of 48 pesticides in agricultural products by capillary gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2508-2518.
11. Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO, 1994. Modificación vigente 1996. Control de residuos tóxicos en carne, grasa, hígado y riñón de bovinos, equinos, porcinos y ovinos, por lo que se denominará grasa, hígado, músculo y riñón de aves, bovinos, caprinos, cérvidos, equinos, ovinos y porcinos. Residuos tóxicos. Límites máximos permisibles y procedimientos de muestreo. *Diario Oficial de la Federación*. México, D.F.
12. Norma Oficial Mexicana NOM-028-ZOO, 1995. Determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en hígado y músculo de bovinos, equinos, porcinos, ovinos, caprinos, cérvidos y aves, por cromatografía de gases. *Diario Oficial de la Federación*. México, D.F.
13. Official Methods of Analysis,» Fifteenth Edition, 1990. Organophosphorous Pesticides - Chapter 10, Sections 970.52 (A,B,H (a,b,c), K and O-R), 274-280.
14. Pérez Pertejo, C.M., Y. Ordóñez, R.M. Reguera, R. Balaña Fouce y D. Ordóñez. 2002. Determinación de residuos de siete insecticidas organofosforados en frutas mediante cromatografía de gases con detector de nitrógeno-fósforo y confirmación por espectrometría de masas. *Rev. Toxicol.* 19:55-60.
15. United States Department of Agriculture (USDA). 1991. Analytical Chemistry Laboratory Guidebook. Residue Chemistry. Science and Technology. FSIS. Washington, D.C.
16. United States Department of Agriculture (USDA). 1991. Pesticides Chemical News Guide. Washington, D.C. p 45.
17. Valencia M.E., L.C. Hoyos, M.N. Ballesteros, M.I. Ortega, M.R. Palacios y J.L. Atondo, 1998. La dieta en Sonora: canasta de consumo de alimentos. *Estudios Sociales (Alimentación y Salud)*. Revista de Investigación del Noroeste, 8(15):11-41.
18. Valenzuela, A.I., R. Lorenzini, M.J. Redondo y G. Font. 1999. Matrix solid-phase dispersion microextraction and determination by high-performance liquid chromatography with UV detection of pesticide residues in citrus fruit. *J. Chromatography A.*, 839:101-107.
19. Zahm, S.H. y M.H. Ward. 1998. Pesticides and childhood cancer. *Environmental health perspectives*, 106(3):893-908.