

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCION DE POSGRADO



ADAPTACIÓN DE UNA TECNICA DE ESPECTROFOTOMETRÍA PARA LA
DETECCIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS

Tesis

Que Presenta IRASEMA DEL ROSARIO MALACARA HERRERA
como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGIA AGRICOLA

Saltillo, Coahuila,

Octubre 2017

ADAPTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRÍA PARA LA
DETECCIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS

Tesis

Elaborada por IRASEMA DEL ROSARIO MALACARA HERRERA como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola con la supervisión y aprobación del comité de Asesoría

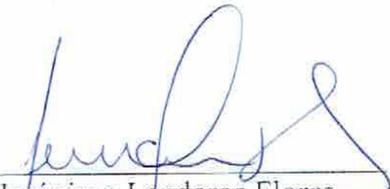


Dr. Ernesto Cerna Chávez

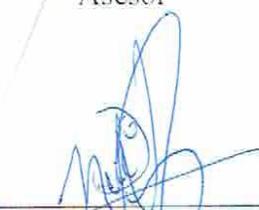
Asesor principal



Dra. Yisa María Ochoa Fuentes
Asesor



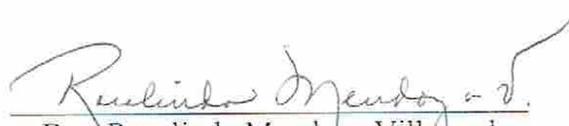
Dr. Jerónimo Landeros Flores
Asesor



Dr. Dino Ulises González Uribe
Asesor



Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe
asesor



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Subdirectora de postgrado

Saltillo, Coahuila

Octubre 2017

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que me apoyaron tanto académicamente, moralmente y emocionalmente, que hicieron para mi de la maestría algo más que obtener un grado en mis estudios. Y a las personas que me mantuvieron fuerte por su partida.

Muchas Gracias

DEDICATORIA

A Pau

ÍNDICE

	PÁGINA
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
RESUMEN	ix
ABSTRAC	x
INTRODUCCIÓN	1
REVISION DE LITERATURA	3
Plaguicidas	3
Clasificación toxicológica de los plaguicidas por su modo de acción.....	4
Uso de plaguicidas en la agricultura	10
Plaguicidas inhibidores de la acetilcolinesterasa (ACE)	11
Organofosforados.....	12
Carbamatos.....	13
Acetilcolinesterasa	14
Acetilcolinesterasa en insectos.....	15
Acetilcolinesterasa sintética.....	16
Residuos de plaguicidas organofosforados y carbamatos en alimentos y medio ambiente	16
Contaminación de los alimentos.....	17
Contaminación del medio ambiente.....	18
Límites máximos de residuos	19
Métodos empleados en el análisis de residuos de plaguicidas	20
Cromatografía de gases (GC).....	21
Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	23
Espectrofotometría de masas.....	25
Espectrometría de masas (MS).....	26
Electroforesis capilar.....	27

Técnica de placas ensayo indirecto inmunoabsorbido ligado a enzimas (ELISA).....	30
Método Ellman	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
Preparación de las concentraciones	32
Determinación del colorante ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB)	33
Determinación del sustrato Yoduro de acetilcolina (ATChi)	33
Determinación de la enzima acetilcolinesterasa (ACE)	33
Análisis de resultados	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB)	35
Yoduro de acetilcolina (ATChi)	36
Acetilcolinesterasa (ACE)	37
CONCLUSIÓN	40
REFERENCIAS	41
ARTICULO CIENTIFICO	45

ÍNDICE DE CUADROS

	PÁGINA
Cuadro 1. Tiempo óptimo de reacción para el colorante ácido 5,5'-ditio-bis-2nitrobenzoico (DTNB).....	35
Cuadro 2. Tiempo óptimo de reacción para el sustrato Yoduro de acetilcolina (ATChI).....	37
Cuadro 3. Tiempo óptimo de reacción para la enzima Acetilcolinesterasa (ACE).....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Cantidad de sustrato saturante para el colorante ácido 5,5'- ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB).....	36
Figura 2. Cantidad de sustrato saturante para el sustrato Yoduro de acetilcolina (ATChI).....	37
Figura 3. Cantidad de sustrato saturante para la enzima acetilcolinesterasa (ACE).....	39

Resumen

Adaptación de una Técnica de Espectrofotometría para la Detección de Residuos de Plaguicidas. Irasema del Rosario Malacara Herrera. M.C Parasitología Agrícola.

Universidad Autónoma “Agraria Antonio Narro”. Dr. Ernesto Cerna Chávez

Existen métodos convencionales de detección de residuos de plaguicidas que son complejos, requieren de reactivos caros, equipos sofisticados y su análisis completo tarda mucho tiempo, tal es el caso de la técnica HPLC, la cromatografía de gases y la espectrofotometría de masas. Caso contrario ocurre con la técnica ELISA la cual se emplea en la detección y cuantificación rápida, específica y muy sensible de residuos de plaguicidas en alimentos y el ambiente teniendo como limitante la producción de anticuerpos, en específico la enzima acetilcolinesterasa para realizar la técnica. Sin embargo, la acetilcolinesterasa, se puede obtener sintéticamente, esta enzima puede ser inhibida por un grupo específico de insecticidas que son los organofosforados y carbamatos los cuales después de su aplicación siguen siendo tóxicos. Por lo anterior, se determinó el tiempo óptimo de reacción y la cantidad de sustrato saturante de la enzima acetilcolinesterasa, el colorante ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico y el sustrato yoduro de acetilcolina. Donde se determinó que al minuto 3 el colorante reacciona a una concentración de 4mM, la enzima bajo el mismo tiempo y a una concentración de 10uM, y finalmente el sustrato a una concentración de 5mM. Estos resultados ayudarán en futuros trabajos a realizar las pruebas donde se haga reaccionar con insecticidas organofosforados y carbamatos en muestras de frutas y verduras para poder relacionar la cantidad de insecticida en función de la enzima acetilcolinesterasa contenida en las muestras.

Palabras clave: *Acetilcolinesterasa, ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico, yoduro de acetilcolina y ELISA.*

Abstract

Adaptation of a Spectrophotometry Technique for the Detection of Pesticide Residues.
Irasema del Rosario Malacara Herrera. M.C Parasitología Agrícola.

Universidad Autónoma “Agraria Antonio Narro”. Dr. Ernesto Cerna Chávez

There are conventional methods of detection of pesticide residues which have a complex method, those methods require expensive reagents, sophisticated equipment and the complete analysis takes a long time to accomplish a result, such as the HPLC technique, gas chromatography and mass spectrophotometry.

Otherwise, the ELISA technique, who is a specific and sensitive methodology, is used to detect the rapid quantification of the residues of pesticides in food and the environment with the limitation of the production of antibodies, in particular case of the enzyme acetylcholinesterase in order to perform this technique. However, the acetylcholinesterase, can be obtained synthetically, this enzyme can be inhibited by a specific group of insecticides which are the organophosphates and the carbamates which after its application remain toxic. Therefore, the optimum reaction time was determined and the amount of saturating substrate of the enzyme acetylcholinesterase as well, also the concentration of the acid colorant 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoic and the acetylcholine iodide substrate its known. It was determined that at the minute 3, the colorant reacts whit a concentration of 4mM, the enzyme also react under at the same time but whit a concentration of 10uM, and finally the substrate reacts whit a concentration of 5mM. These results will help in future work to perform tests where it is reacted with organophosphate and carbamate insecticides in samples of fruits and vegetables, to relate the amount of insecticide based on the acetylcholinesterase enzyme contained in the samples.

Key words: *Acetylcholinesterase, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, acetylcholine iodide and ELISA.*

INTRODUCCIÓN

La forma en que los plaguicidas han sido utilizados, y la manera en que se perciben, están cambiando por el daño que producen a la salud, esto, por el desarrollo de nuevas tecnologías y su aplicación en el análisis de residuos en los alimentos (Lehotay, 1998), el mismo autor también menciona que en los años 40`s y 50`s los plaguicidas eran vistos como productos químicos milagrosos que daban enormes ganancias por el rendimiento de los cultivos por lo tanto eran utilizados excesivamente afectando al medio ambiente.

El análisis químico juega un papel importante, la elección de una técnica analítica adecuada para la determinación de plaguicidas depende de factores tales como las propiedades de los analitos, efectividad, rapidez, fiabilidad, selectividad y sensibilidad, coste, disponibilidad, compatibilidad con el medio ambiente y capacidad de análisis. En la actualidad la cromatografía de gases (GC) la cual puede ser utilizada para separar compuestos orgánicos basada en sus volatilidades; la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) que se utiliza para separar e identificar compuestos en base a su polaridad; la Espectrofotometría de masas (ES) en donde las moléculas ionizadas de la muestra explotan en una variedad de fragmentos, el patrón de fragmentación constituyen el espectro de masas, este espectro es único y puede ser usado como su “huella química” para caracterizar el compuesto; y la Electroforesis capilar (CE) su mecanismo es la movilidad electroforética de los analitos en disolución y así separar los compuestos; Son las técnicas más utilizadas en el análisis de plaguicidas (Lehotay, 1998; Ravelo, 2009; Klein *et al*, 2006) siendo las más importantes la GC y HPLC (Andreu y Picó, 2004). Estos métodos convencionales son complicados, requieren de reactivos caros, equipos muy sofisticados y su completo análisis tarda por lo general mucho tiempo (Tejada *et al.*, 1998).

Por ello es importante crear nuevas metodologías analíticas que sirvan para detectar residuos de plaguicidas las cuales sean rápidas, económicas y aplicables. Tal es el caso de la técnica ELISA que está basada en anticuerpos monoclonales, sustratos y enzimas que se emplean en la detección y cuantificación rápida, específica y muy sensible de residuos de plaguicidas en alimentos y el ambiente (González *et al.*, 2005). Por lo que la enzima

Acetilcolinesterasa (ACE) que se encuentra en el neurosistema de los insectos y otros animales puede ser inhibida por un grupo específico de insecticidas que son los organofosforados y carbamatos que son extremadamente tóxicos después de la aplicación (Tejada et al., 1998). Existen fuentes de esta enzima que se puede obtener sintéticamente, de los grupos de las colinesterasas de vertebrados es la colinesterasa verdadera, la cual su estructura molecular de la ACE se estableció para el órgano eléctrico de la anguila (*Electrophorus electricus*), y es válida para todos los tejidos y especies estudiados las cuales son capaces de catalizar reacciones químicas como las enzimas verdaderas (Sánchez y Salceda, 2008).

Debido a lo anterior se realizó una adaptación a la técnica ELISA basada en anticuerpos monoclonales con el objetivo de utilizar la enzima acetilcolinesterasa (ACE) como un indicador de residuos de plaguicidas para crear una nueva técnica más eficiente y económica.

REVISIÓN DE LITERATURA

Plaguicidas

La Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (Cofepris) define a los plaguicidas como cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores que transmiten enfermedades humanas y animales, las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal así como las que interfieran con el bienestar del hombre y de los animales.

El uso de plaguicidas se extiende hasta el año 1000 A.C. en Grecia donde se utilizaba el sulfuro como agente antipeste para combatir organismos no deseados en los cultivos, y la quema de azufre para purgar las casas. Los chinos utilizaban el arsénico para eliminar insectos de los jardines y fue hasta la mitad del siglo XIX que comenzaron a realizarse y a utilizar mezclas de compuestos para una mayor efectividad. En Francia en 1865 la mezcla bordeaux se utilizó para combatir el moho de las uvas, compuesta por sulfato de cobre, lima y agua. Con el estudio y entendimiento de las plagas fue mejorando el uso de estos compuestos, la era moderna del uso de los plaguicidas se dio con el uso del DDT en el año 1939 durante la segunda guerra mundial, fue el plaguicida de mayor uso en Estados Unidos y luego de la segunda guerra mundial se produjeron cantidades mayores para el control de vectores de enfermedades como el tifus y la malaria. En 1945 se difundió su uso ya que su costo era razonable, por efectividad, persistencia y versatilidad (Ware, 2004) llegando el año 1959 su uso decayó marcadamente por el incremento en la resistencia de insectos, el desarrollo de plaguicidas alternativos más efectivos, los problemas públicos sobre los efectos alternos no deseados y por las restricciones impuestas por los gobiernos para su uso (EPA, www.EPA.gov). La publicación de primavera silenciosa de Rachel Carson en 1962 causó controversia entre los pro y contras del uso del DDT, poniendo en alerta a los gobiernos y a toda la población, y en el año 1970 se prohibió la venta y uso de este compuesto. Se continuó con el desarrollo de sustancias que debido a su composición

química no eras persistentes en el medio ambiente, a estos se les llamo plaguicidas organofosforados (Carson, 2002).

Clasificación toxicológica de los plaguicidas por su Modo de acción

El Comité de Acción de Resistencia al Insecticida (IRAC por sus siglas en inglés) proporciona una clasificación de modos de acción (MdA) en una guía que permite a los agricultores, productores, técnicos y profesionales de la protección de cultivos en general seleccionar los insecticidas adecuadamente en una estrategia de Manejo de Resistencia a Insecticidas/acaricidas (MRI) y este sea eficaz y sostenible. Esta estrategia tiene como objetivo prevenir o retrasar la evolución de resistencias a los insecticidas además de ayudar a que cierta población de insectos resistentes retome su susceptibilidad. La clasificación desarrollada y aprobada por IRAC se funda en los mejores datos que están disponibles acerca del modo de acción de los insecticidas y aprobada por reconocidos toxicólogos y bioquímicos especializados en insectos. Para determinar un modo de acción se identifica la proteína responsable del efecto biológico, también se pueden formar grupos de compuestos cuando se comparte el efecto fisiológico que lo caracteriza y se tienen estructuras químicas relacionadas.

Clasificación por Modo de Acción (IRAC). Versión 8.3, Julio de 2017

Acción sobre el sistema nervioso o muscular

La mayoría de estos insecticidas actúan sobre el sistema nervioso o muscular y generalmente son de acción rápida.

Grupo 1: Inhibidores de la Acetilcolinesterasa

Subgrupo 1A Carmabamatos

Subgrupo 1B Organofosforados

Inhiben la ACE, causando hiperexcitación. La ACE es la enzima que finaliza la acción de excitación neurotransmisora de la acetilcolina en la sinopsis nerviosa.

Grupo 2: Bloqueadores del canal cloruro dependiente de ácido gammaaminobutirico (gaba)

Subgrupo 2A Organoclorados de coclodieno

Subgrupo 2B Fenilpirazoles (fiproles)

Se provoca una hiperexcitacion y convulsiones al bloquear el canal de cloro, activado por GABA, que es el principal neurotransmisor inhibidor en los insectos.

Grupo 3: Moduladores del Canal de Sodio

Subgrupo 3A Piretrodes – Piretrinas

Subgrupo 3B DDT -Metoxiclor

Los canales de sodio se mantienen abiertos produciendo una sobreexcitación, algunas veces bloqueo nervioso, están implicados en la propagación de potenciales de acción a lo largo de los axones nerviosos.

Grupo 4 Moduladores Competitivos del Receptor Nicotinico de la Acetilcolina

Subgrupo 4A Neonicotinoides

Subgrupo 4B Nicotina

Subgrupo 4C Sulfoximinas

Subgrupo 4D Butenolidos

Subgrupo 4E Mesoiónica

En el receptor se unen al sitio de la acetilcolina, se provocan una serie de síntomas que van desde hiperexcitacion a letargia y parálisis. Siendo la acetilcolina el principal neurotransmisor excitador en el sistema nerviosos central del insecto.

Grupo 5: Modulador Alosterico del Receptor Nicotinico de la Acetilcolina

Espinosinas

Se activan alostéricamente los receptores nicotínicos de la acetilcolina, esto causa una sobreexcitación del sistema nervioso.

Grupo 6: Modulador Alosterico del Canal de Cloro dependiente de Glutamato

Avermectinas y Milbemicinas

Alostericamente activan el glutamato en los canales de cloro, provocando parálisis. El glutamato es un neurotransmisor inhibidor muy importante en insectos.

Moduladores del Canal TRPV de los Organos Cordotonales.

Grupo 9:

Subgrupo 9B Derivados de Piridina Azometina

Enlaza y rompe la entrada de los complejos Nan-Lav del canal receptor de potencial transitorio vaniloide (TRPV) en órganos cordotonaes receptores del estiramiento, que son cruciales para los sentidos de la audición, la gravedad, el equilibrio, la aceleración, la propiocepción y la cinestesia. Esto interrumpe la alimentación y otros comportamientos de los insectos.

Grupo 14: Bloqueadores de Canales del Receptor de Acetilcolina Nicotínico (NACHR)

Análogos de la Nereistoxina

Bloquean el canal de iones receptor de la acetilcolina nicotínico por lo cual se produce una interrupción del sistema y una parálisis.

Grupo 19: Agonistas del Receptor de Octopamina

Amitraz

Se activan los receptores de octopamina, produciendo una hiperexcitación. La octopamina en insectos es semejante a la adrenalina, la neurohormona de lucha o vuelo.

Grupo 22: Bloqueadores del Canal de Sodio Dependiente del voltaje.

Subgrupo 22A Oxadiazinas

Subgrupo 22B Semicarbazones

Bloquean los canales de sodio provocando el colapso del sistema nervioso y la parálisis. Los canales de sodio están estrechamente involucrados en la propagación de potenciales de acción a lo largo de los axones nerviosos.

Grupo 28: Moduladores del Receptor de la Rianodina

Diamidas

Activan los receptores musculares de la rianodina, causando contracción y parálisis. Los receptores de la rianodina intervienen en la liberación de calcio en el citoplasma desde sus reservas intracelulares.

Grupo 29: Moduladores de los Órganos Cordotonaes- sin punto de acción definido.

Flonicamid

Impiden la función de los órganos cordotonaes receptores de estiramiento, que son críticos para los sentidos de gravedad, equilibrio, propiocepción y la cinestesia. Se interrumpe la alimentación y otros comportamientos de los insectos. A diferencia del

grupo 9, estos insecticidas del grupo 29 no se unen al complejo Nan-lav del canal TRPV.
Acción sobre el crecimiento y desarrollo

El desarrollo de los insectos se controla por el equilibrio de dos hormonas principales que son la hormona juvenil y la ecdisona. Los reguladores del crecimiento de los insectos se comportan imitando una de estas hormonas o alterando directamente la formación/deposición de la cutícula o la biosíntesis de lípidos. La acción de los insecticidas que actúan sobre los diferentes objetivos del sistema es lenta a moderadamente lenta.

Grupo 7: Miméticos de la Hormona Juvenil

Subgrupo 7^a A Análogos de la Hormona Juvenil

Subgrupo 7B Fenoxicarb

Subgrupo 7C Piriproxifén

Se aplican en el estadio premetamórfico interrumpiendo e impidiendo la metamorfosis

Grupo 10: Inhibidores del Crecimiento de Acaros

Subgrupo 10A Clofentezin- Diflovidazin- Hexitiazox

Subgrupo 10B Etoxazol

El modo de acción de este grupo no está completamente definido, pero si se conoce que provoca la inhibición del crecimiento.

Grupo 15: Inhibidores de la Biosíntesis de Quitina, Tipo O

Benzouureas

Solo se conoce que causa la inhibición de la biosíntesis de la quitina, su modo de acción no está definido completamente.

Grupo 16: Inhibidores de la Biosíntesis de la Quitina, Tipo 1

Buprofezin

En este grupo tampoco se conoce completamente el modo de acción, pero causa inhibición de la biosíntesis de quitina en un conjunto de insectos, se incluye la mosca blanca.

Grupo 17: Disruptores de la Muda, Dipteros

Ciromazina

Modo de acción indefinido y causa la interrupción de la muda.

Grupo 18: Agonistas del Receptor de Ecdisona

Diacilhidracinas

Se induce a una muda precoz, imitando a la hormona de la muda, la ecdisona.

Grupo 23: Inhibidores de la Acetil CoA Carboxilasa

Derivados de los Ácidos Tetronico y Tetramico

Se inhibe la coenzima acetil A carboxilasa, la cual es parte del primer paso de la biosíntesis de los lípidos, esto ocasiona la muerte del insecto.

Acción sobre la respiración

Al llevarse a cabo la respiración mitocondrial se produce una molécula que da energía a todos los procesos celulares vitales, el ATP. Una cadena de transporte e electrones ubicados en las mitocondrias se almacena la energía originada por la oxidación en forma de un gradiente de protones, lo que genera la síntesis de ATP. Son varios los insecticidas conocidos por participar en la respiración mitocondrial mediante la inhibición del transporte de electrones y/o fosforilación oxidativa. La acción de los insecticidas que intervienen sobre los distintos sitios de este sistema por lo general van de rápidos a moderadamente rápidos.

Grupo 12: Inhibidores del ATP- Sintasa_Mitocondrial

Subgrupo 12A Diafentiuron

Subgrupo 12B Acaricidas Organotinas

Subgrupo 12C Propargito

Subgrupo 12D Tetradifon

Inhiben la enzima que sintetiza ATP.

Grupo 13: Desunión de Fosforilación Oxidativa mediante interrupción del gradiente de Protones

Pirroles- Dinitrofenoles- Sulfluramid

Los protonoforos cortocircuitan el gradiente protónico mitocondrial para que el ATP no pueda ser sintetizado

Grupo 20: Inhibidores del Transporte de Electrones en el Complejo Mitocondrial

III

Subgrupo 20A Hidrametilnon

Subgrupo 20B Acequinocil

Subgrupo 20C Fluacipirim

Subgrupo 20D Bifenazato

Se inhibe el transporte de electrones en el complejo III, evitando el que las células utilicen su energía.

Grupo 21: Inhibidores del Transporte de Electrones en el Complejo Mitocondrial I

Subgrupo 21A acaricidas e Insecticidas METI

Subgrupo 21B Rotenona

Se impide el uso de la energía celular inhibiendo el transporte de electrones en el complejo I

Grupo 24: Inhibidores del Transporte de Electrones en el Complejo Mitocondrial IV

Subgrupo 24A Fosfinas

Subgrupo 24B Cianidas

Inhiben el transporte de electrones en el complejo IV, evitando el uso de la energía celular.

Grupo 25 Inhibidores del Transporte de Electrones en el Complejo Mitocondrial

II

Subgrupo 25A Derivados del Beta-Centonitrilo

Subgrupo 25B Carboxanilidas

Se impide el uso de la energía de las células al inhibir el transporte de electrones en el complejo II

Acción en intestino medio

Las toxinas microbianas de lepidópteros específicos se pulverizan o se expresan en variedades de cultivos transgénicos.

Grupo 11: Disruptores Microbianos de las Membranas del Intestino Medio de Insectos

Subgrupo 11A *Bacillus thuringiensis* y las Proteínas Insecticidas que producen

Subgrupo 11B *Bacillus sphaericus*

Las toxinas de las proteínas se enlazan a los receptores en la membrana del intestino medio, causando la formación de poros generando in desequilibrio iónico y septicemia.

Modo de acción desconocido no específico

Se conoce que varios insecticidas afectan a sitios o funciones de un modo desconocido, o actúan de una manera no específica sobre varios sitios. Grupo 8: Diversos Inhibidores

No Específicos (multi-sitio)

Subgrupo 8A Halogenunros de Alquilo

Subgrupo 8B Cloropicrina

Subgrupo 8C Fluoruros

Subgrupo 8D Boratos

Subgrupo 8E Tartaro Emetico

Subgrupo 8F Generadores de Isotiocianato de Metilo

Grupo UN: Compuestos de modo de acción desconocido o incierto azadiractin- benzoximato- bromopropilato- quinometionato- dicofol- peptido gs-omega/cappa hxtxhv1a- azufre de cal- piridil- azufre

(IRAC Español, 2011; IRAC España, 2016; IRAC EU, 2017)

Uso de plaguicidas en la agricultura

El aprovechamiento de los plaguicidas en la agricultura es esencial para su progreso económico, permitiendo el cuidado de los cultivos ante plagas y enfermedades, incrementando su periodo de desarrollo de las plantas, aumentando el periodo de almacenamiento post-cosecha y reduciendo los costes de la producción de alimentos. El crecimiento continuo de la población global requiere una producción de alimentos muy grande, es por eso que la protección de los cultivos es muy necesaria contra el daño de parásitos y otros agentes biológicos. El uso de plaguicidas se ha incrementado considerablemente a lo largo de los últimos 35 años, alcanzando tasas de crecimiento del 4 al 5,4%. En los años noventa se apreció una disminución del uso de insecticidas, tanto en países desarrollados, como Francia, Alemania y el Reino Unido, como en unos cuantos países en desarrollo, como la India. Sin embargo, el uso de herbicidas continuó aumentando en la mayoría de los países (FAO, 2003). La llegada de los plaguicidas orgánicos para controlar plagas en la agricultura fue una de las tecnologías más aceptadas y establecidas rápidamente en toda la historia de la agricultura mundial

(March et al, 2010). El principal uso de los plaguicidas es ayudar a controlar las plagas como insectos, ácaros, aves, roedores, nemátodos, hongos, bacterias, malezas que dañan cultivos disminuyendo los rendimientos, por lo que habitualmente se realizan trabajos con el fin de cuantificar la importancia de las pérdidas y la eficiencia de las medidas de control (March, 2014). El proceso de transformación que la agricultura ha sufrido las últimas décadas en todo el mundo, la ha convertido en un sector de actividad plenamente

capitalista, la revolución verde, ha creado un gran aumento de la productividad, con posibilidades de diversas formas más intensivas de trabajo y capital y una continua innovación tecnológica (Sabartés, 1994). El empleo de plaguicidas son uno de los desarrollos tecnológicos que forma parte complementaria de las prácticas agrícolas, han contribuido al desarrollo social moderno en la economía, ya que ha permitido un gran incremento de la producción agraria mundial, por otra parte, desde el punto de vista sanitario, su aplicación lidia contra vectores de enfermedades infecciosas. Gracias al uso de estos, se cuenta con una permanente disponibilidad de algunos vegetales frescos que si no fuera así solo se encontrarían en tiempos concretos en algunos mercados, esto permite dietas alimenticias más sanas (Espluga, 2001).

El presente trabajo se realizó tomando en cuenta el modo de acción del grupo número uno, los inhibidores de la acetilcolinesterasa, donde a continuación se describirán más a detalle.

Plaguicidas Inhibidores de la Acetilcolinesterasa (ACE)

Determinado grupo de insecticidas, como los carbamatos y los organofosforados son compuestos químicos que comparten una función en común en los organismos, la inhibición de un grupo de enzimas llamadas acetilcolinesterasas (Ibarra y Linares, 2012) estos compuestos son utilizados principalmente para controlar plagas de artrópodos, sin embargo, en algunas situaciones son venenosos o tóxicos para el medio ambiente y los seres humanos (Fishel, 2012); y son los más utilizados a nivel mundial (Shosinsky, 2004). La aplicación que obtuvo la enzima ACE en la agricultura es gracias a los efectos que tiene sobre el sistema nervioso de los invertebrados los cuales son perjudiciales en los cultivos. Estos plaguicidas pueden interactuar con el sitio activo de la enzima de una manera irreversible como reversible, ocasionando la muerte del organismo que entra en contacto con el inhibidor, en este caso, la plaga (Houghton *et al.*, 2006).

Los compuestos organofosforados y carbamatos van a reaccionar con la enzima, al igual que lo hace la acetilcolina, es decir que inhiben competitivamente la actividad colinesterastica actuando como sustancias anticolinesterasicas así permitiendo que la

acetilcolina siga ejerciendo su actividad, esta enzima es la responsable de la destrucción y terminación de la actividad biológica del neurotransmisor acetilcolina, cuando la enzima se inhiba se acumula acetilcolina en el espacio simpático alterando el funcionamiento normal del impulso nervioso. La acumulación de la acetilcolina se origina en las uniones colinérgicas neuroefectoras a esto se le llama efecto muscarínico, en las uniones mioneurales del esqueleto y los ganglios autónomos (efectos nicotínicos) así como en el sistema nervioso central (Calabuig, 1998; Dueñas *et al.*, 1999).

Organofosforados

Principalmente son esteres derivados de ácidos fosfóricos, fosfonico, fosforotioico o fosfonotioico y a veces poseen un grupo amida o tiol (Enao, 2005) son bastantes estables y fáciles de sintetizar, por su alto grado de toxicidad son utilizados como pesticidas y como armas químicas; su toxicidad es causada por la interacción fuerte e irreversible entre ellos y la triada del sitio activo de la enzima ACE, originando una pérdida definitiva de la actividad enzimática, siguiendo con efectos adversos sobre la sinapsis colinérgica. Existe una baja selectividad de estos compuestos que afectan a los humanos, y llevándolos a que su uso sea restringido y en ocasiones su prohibición (Pohanka, 2011). Dentro del grupo de los organofosforados se encuentran los insecticidas por su ingrediente activo: Acefato, Azamethiphos, Azinfos-etilo, Azinfosmethyl, Cadusafos, Cloretoxifos, Clorfenvinfos, Clormefós, Clorpirifos, Clorpirifos-metilo, Coumaphos, Cianofos, Demeton - S - metilo, Diazinon, Dichlorvos / DDVP, Dicrotophos, Dimetoato, Dimetilvinfos, Disulfoton, EPN, Etio, Ethoprophos, Famphur, Fenamifos, Fenitrotión, Fenthion, Fostiazato, Heptenophos, Imicyafos, Isofenfos, Isopropilo O - (metoxiamino - fosforil) salicilato, Isoxatión, Malatión, Mecarbam, Methamidophos, Methidathion, Mevinphos, Monocrotofos, Naled, Ometoato, Oxidemetón-metilo, Paratión, Paratiónmetilo, Phenthoate, Phorate, Phalalone, Phosmet, Phosphamidon, Phoxim, Pirimifosmetilo, Profenofos, Propetamphos, Prothiofos, Pyraclofos, Pyridaphenthion, Quinalphos, Sulfotep, Tebupirimfos, Temephos, Terbufos, Tetraclorvinfos, Thiometon, Triazophos, Triclorfón, Vamidothion (IRAC, 2017).

Carbamatos

Son compuestos químicos derivados del ácido carbámico, son menos dañinos que los organofosforados, ya que la interacción con el activo se da de forma reversible, dejando que la enzima pueda restablecer su actividad; su uso más común es para controlar plagas en jardines, en países del tercer mundo se sustituyen por organofosforados para el control del mosquito *Anopheles*, el cual es el vector de la malaria. En el medio ambiente tiene una vida corta, en el medio acuático su vida puede ir de media a larga, resultando tóxico para los peces y otros organismos acuáticos (Elersek, *et al.*, 2011). Algunos carbamatos son más biodegradables y contienen más bajas cantidades de tóxicos que la mayoría de los organofosforados comunes, los efectos tóxicos de los carbamatos para los animales, como se ha mencionado anteriormente, que se debe a que inhiben la acetilcolinesterasa, a lo contrario de los organofosforados, estos lo hacen sin la necesidad de realizar una biotransformación anterior, por lo siguiente son considerados como inhibidores directos (Manahan, 2007). Integran el grupo de los carbamatos: Alanycarb, Aldicarb, Bendiocarb, Benfuracarb, Butocarboxim, Butoxicarboxim, Carbaryl, Carbofuran, Carbosulfan, Ethiofencarb, Fenobucarb, Formetanato, Furathiocarb, Isoprocarb, Metiocarb, Methomyl, Metolcarb, Oxamilo, Pirimicarb, Propoxur, Tiodicarb, Tiofanox, Triazamato, Trimethacarb, XMC y Xililcarb (IRAC, 2017).

Acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa (AChE; código enzimático 3.1.1.7) es una enzima fundamental en el funcionamiento del sistema nervioso del cuerpo humano, vertebrados e insectos; inactiva el químico mensajero acetilcolina, el cual es normalmente activo en las uniones entre nervios y músculos, entre nervios y glándulas, y también en la sinapsis dentro de

ciertos nervios en el sistema nervioso central; en el momento en que los niveles de colinesterasa son bajos por la abundante inhibición, el sistema nervioso podría funcionar mal, y por lo tanto terminar en la muerte (Fishel, 2012).

Ha sido una de las enzimas más estudiadas desde su descubrimiento en la década de 1920, referente al efecto fisiológico, mecanismo de acción, naturaleza de su centro activo, como también a su distribución y su localización en diferentes tejidos; pertenece a una familia de enzimas conocidas como colinesterasa, a lo que pueden ser definidas como un grupo de esterases de serina capaces de hidrolizar ésteres de colina, como la acetilcolina (Sánchez y Salceda, 2008)

Ibarra y Linares (2012) mencionan que existen dos grupos en los que se divide la acetilcolinesterasa: 1) La acetilcolinesterasa verdadera la cual es una enzima esencial con un gran grado de especificidad en lo que respecta al sustrato, se encuentra unida a estructuras celulares en las regiones de la sinapsis colinérgicas, sustancia gris del sistema nervioso central, los ganglios autonómicos, la sinapsis simpática pre y postganglionar y las terminaciones motoras de los músculos, al igual que en las sinapsis postganglionar parasimpáticas y los eritrocitos; tiene la función fisiológica de desdoblar rápidamente la acetilcolina neurotransmisora en colina y ácido acético, de modo que la inactiva. 2) Las colinesterasas (CE), llamadas también colinesterasas no específicas tales como pseudocolinesterasas, colinesterasas plasmáticas o séricas y las butircolinesterasas, forman un grupo de isoenzimas; tienen baja especificidad y están presentes en todo el organismo, la función fisiológica es desconocida y una de sus funciones es la detoxificación de fosfatos y carbamatos.

Acetilcolinesterasa en insectos

Como ya se mencionó anteriormente, la enzima acetilcolinesterasa es esencial para el funcionamiento del sistema nervioso, así que a continuación se hará mención sobre el sistema nervioso de los insectos.

El sistema nervioso de los insectos está formado por células altamente especializadas para la sensación, conducción y coordinación, llamadas neuronas. Cada neurona posee un cuerpo celular donde está el núcleo, de este salen una serie de prolongaciones pequeñas de manera arborescente llamadas dendritas, las cuales son las receptoras de los estímulos y otras prolongaciones llamadas axón que termina en una serie de fibrillas nombradas arborizaciones que son transmisoras de los estímulos. Se pueden encontrar tres tipos de neuronas, las sensoriales ubicadas a la altura de la epidermis del exoesqueleto con la función de captar los estímulos exteriores y transmitirlo al interior; las motoras se encuentran en los ganglios que transmiten los impulsos hacia afuera, ya sea hacia los músculos o glándulas; y las asociadas que se encuentran entre las sensoriales y las motoras, siempre ubicadas en los ganglios del sistema nervioso central, dirigen, modifican y coordinan los impulsos recibidos de otras neuronas sensoriales para unir la respuesta al organismo a modo de un todo. El sistema nervioso se compone de un cerebro dorsal, ganglios subesofágicos y un doble cordón nervioso conectado con la región cefálica que se encuentra debajo del aparato digestivo. La función es realizar la sinapsis, impulsos que pasan de una neurona a otra cuando se logran encontrarse las fibrillas terminales del axón de una, con las dendritas de la otra, sin enlazarse completamente. El estímulo origina una onda de ionización llamadas también cargas eléctricas que recorren a lo largo del axón a la sinapsis, se produce entonces un transmisor químico intermedio llamado acetilcolina con el fin de transmitir el estímulo a la siguiente neurona, después la acetilcolina es desdoblada en acetil más colina por acción de la enzima colinesterasa, dándole tiempo a la sinapsis para un nuevo estímulo (Klowden, 2007; Klowden 2013)

Como se ha venido mencionando el modo de acción de algunos insecticidas (carbamatos y organofosforados) inhiben a la acetilcolinesterasa, el cual se da a nivel de la sinapsis, impidiendo el desdoblamiento de la acetilcolina, permaneciendo una constante transmisión de impulsos nerviosos irregularizando todo el sistema, manteniendo la tensión constante hasta causar la muerte del insecto (Doria, 2009).

Acetilcolinesterasa sintética

En 1967 fue extraído del órgano eléctrico de la gymnota una anguila gigante del

Amazonas por Leuzinger Baker la acetilcolinesterasa. Esta especie está formada por 5000 células activas en serie como una pila Volta, las cuales se suman las diferencias de potencial que logra cada célula de 100milivoltios como cualquier neurona, y produce descargas de 600V con lo cual paraliza a sus presas. Se encuentra en el hígado, mucosa intestinal, páncreas, cerebro y musculo en forma inactiva (Domínguez, 1986). Es un compuesto con un peso molecular de 240.000, las unidades moleculares del suero tienen un peso de 80000 y probablemente sea un agregado (Agrest, 1975).

Residuos de plaguicidas organofosforados y carbamatos en alimentos y medio ambiente

Se define residuo de plaguicida a cualquier sustancia específica existente en los alimentos, productos agrícolas y demás tipos de productos o alimentos para animales, como también en el medio ambiente, específicamente en el suelo, aire y agua a consecuencia del uso de un plaguicida. A este término se le integra cualquier derivado de un plaguicida, ya sean productos de conservación, metabolitos, productos de descomposición, productos de reacción e impurezas de importancia toxicológica o ecotoxicológica. Forma parte del concepto residuo de plaguicidas tanto los residuos de procedencia desconocida o inevitables, por ejemplo, la contaminación ambiental, como los derivados de usos evidentes y autorizados de la sustancia química (FAO/OMS, 2014).

Actualmente los plaguicidas que son más utilizados debido a su menor persistencia en el medio son los carbamatos y los organofosforados, son potencialmente menos peligrosos para el consumidor, quedando más limitado su efecto tóxico a la manipulación por el fabricante, distribuidor o agricultor. Por la importante toxicidad aguda de los organofosforados ya se han sometido a importantes restricciones que incluye algunas cancelaciones de su uso por sus riesgos tóxicos a largo plazo y su propagación (Gil, 2010). Estos compuestos pueden no ser tan persistentes en el medio ambiente, pero si son más tóxicos para el ser humano (Cabildo *et al*, 2013) y la vía de absorción más importante es el aparato digestivo por la ingestión de alimentos y agua contaminada (Ramírez y Lascaña, 2001).

Contaminación de los alimentos

La población se expone continuamente a plaguicidas a causa de la contaminación de los alimentos con estos productos, ya que se encuentran residuos de plaguicidas en alimentos por el uso excesivo de estos en el sector agropecuario, por la recolección de los productos agrícolas sin respetar el intervalo de seguridad o su tiempo de carencia entre lo que es su última aplicación y la cosecha, por la contaminación durante el almacenamiento, transporte, comercio y/o la preparación de los alimentos. Esto se presenta normalmente en las etapas finales del desarrollo de los cultivos y durante el almacenamiento de los productos agrícolas, es muy frecuente ya que los agricultores fumiguen el producto desde de la cosecha e incluso antes de llevarlo al mercado. La frecuente aplicación en los cultivos determina el grado de contaminación de lo cosechado y se puede afirmar que actualmente es más probable y frecuente encontrar residuos de plaguicidas en los alimentos que en muchos de los casos son concentraciones que rebasan los límites de tolerancia recomendadas por la FAO/OMS. El riesgo en un niño es mayor ya que se encuentra en periodo de crecimiento por su inmadurez fisiológica y proporcionalmente consumen más alimentos por peso corporal que los adultos aparte que consumen más frutas y verduras las cuales contienen más altos niveles de concentración de residuos de plaguicidas (Bolivia, 2008).

Contaminación del medio ambiente

Así como la necesidad en la que se ha convertido el uso de los plaguicidas en la agricultura, también la preocupación por el riesgo que este tiene a la salud como al medio ambiente, ya que puede contaminar cuerpos de agua, el aire y el suelo (Tappe *et al*, 2002)

La contaminación del agua se debe a la aplicación directa de plaguicidas con el fin de usarse como sebo de peces, la descarga de líquidos sobrantes de la aplicación, desecho de envases vacíos, la inundación o desborde de ríos cercanos a los lugares de almacenamiento, desplazamiento de los compuestos que son arrastrados por las lluvias

hacia cauces, aplicaciones aéreas cercanas a ríos y lagos y la descarga ilegal de residuos industriales. Las consecuencias que se tienen son la pérdida de la flora y fauna acuática, se pierde el recurso como fuente de agua y alimento ya que origina intoxicaciones en personas y animales; la contaminación del suelo va desde la aplicación directa del plaguicida en el suelo, goteo desde la planta, caída del equipo aplicador, desecho de envases vacíos, arrastre por las lluvias, derrame accidental, contaminación por fuentes de agua, fitotoxicidad y por las cadenas alimentarias. Si son frecuentemente utilizados, en el caso de la ganadería, estos de estar en el suelo pueden pasar al forraje y ser absorbidos por los animales, depositándose en su grasa, aumentando así las concentraciones de residuos en la carne y la leche. Favorecen a la erosión ya que afectan a los microorganismos del suelo disminuyendo la descomposición de la materia orgánica dando lugar a la modificación de la estructura de los suelos aminorando su fertilidad. La determinación y evaluación del grado que tiene la contaminación en el suelo es de mucha importancia, ya que estos se transfieren a los alimentos; la contaminación del aire se da por la aplicación aérea no controlada la cual ocasiona problemas tóxicos en poblados próximos a zonas agrícolas, por las pérdidas durante el traslado y transporte durante la aplicación y por la evaporación de aguas contaminadas. Se pueden desplazar los contaminantes atmosféricos por medio del movimiento del aire desde sus sitios de origen hasta largas distancias ya que se volatilizan con facilidad durante o inmediatamente de la aplicación (Cervantes, 2008).

Límites Máximos de Residuos

La Comisión del *Codex Alimentarius* fue creada por dos organizaciones de las Naciones Unidas: La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), fija los criterios normativos básicos para todas las naciones y está conformada por comités que se encargan de diferentes aspectos alimentarios (Camean y Reppeto, 2012). El Código Alimentario es un punto de referencia mundial para los consumidores, productores, procesadores de alimentos, organismos nacionales de control de los alimentos y para el comercio alimentario internacional. La influencia que ha tenido sobre la manera de pensar de las personas que

participan en la producción y elaboración de alimentos y de los consumidores ha sido enorme. El impacto se ha generado en todos los continentes, la aportación para proteger la salud de los consumidores y la garantía de prácticas equitativas en el comercio alimentario es inmensa. El objetivo del *Codex alimentarius* es garantizar alimentos inocuos de calidad para todas las personas y en cualquier lugar (FAO, 2017. Que es el Codex, www.fao.org última actualización 06-06-2017).

El comité del *Codex* sobre Residuos de Plaguicidas gestiona los residuos de plaguicidas en los alimentos, verificando anualmente los estudios científicos y estableciendo niveles de seguridad como los límites máximos de residuos (LMR). Tienen como finalidad facilitar el comercio internacional y contribuye a través de sus normas, directrices y códigos de prácticas alimentarias internacionales a que haya inocuidad, calidad y equidad en el comercio internacional de los alimentos (Camean y Reppeto, 2012; FAO, 2016).

Se define como límite máximo de residuo (LMR) o tolerancia a la cantidad máxima de residuo de producto fitosanitario específico que, por ley es permisible en un determinado producto agrícola. Su expresión es en partes por millón (ppm) o en miligramos de residuo por kilogramo del alimento fresco (mg/kg). Existen dos criterios básicos para determinar el límite máximo de residuo de un plaguicida: el toxicológico y el agronómico. El Criterio toxicológico se refiere a la probable ingesta diaria de residuos, la cual debe ser que con total seguridad no provoque ningún efecto nocivo en las personas; El Criterio agronómico permite determinar el nivel real de los residuos en los alimentos de origen vegetal, se expresa en miligramos de plaguicidas por kilo de producto cosechado. Es por esto que se hacen pruebas en campo siguiendo las “buenas prácticas agrícolas”, se realizan tratamientos con dosis adecuadas a la plaga a tratar y respetando los plazos de seguridad (García, 2017).

Existe una base de datos en www.fao.org que enlista los límites máximos de residuos del Codex para los plaguicidas establecidos por la Comisión del *Codex Alimentarius* hasta su 39º periodo de sesiones, incluyendo julio 2016. Aquí se puede obtener la información acerca de los LMR de plaguicidas y para un producto básico o grupo de estos; los nombres

y definiciones de estos productos básicos se encuentran en la Clasificación del Codex de Alimentos y Piensos. Los alimentos que se enumeran no deberán contener una cantidad mayor de residuos de plaguicidas que la es señalada por LMR en (mg/kg) ya sea al punto de entrada en un país o al punto de entrada en canales comerciales de un país. Este límite no podrá excederse a partir de ese momento. En la página se recomienda que al realizar las búsquedas de LMR de un producto, se busque también subgrupos correspondientes y grupos para así poder obtener toda la variedad de los LMR del Codex para el producto en concreto.

Métodos empleados en el análisis de residuos de plaguicidas

Para la cuantificación de residuos de plaguicidas a concentraciones muy bajas, se utilizan diferentes métodos gracias a la disponibilidad de equipos analíticos cada vez más exactos (Ahmed, 2001). El análisis químico tiene un papel importante, elegir una técnica analítica adecuada para la determinación de plaguicidas depende de factores tales como las propiedades de los analitos, efectividad, rapidez, fiabilidad, selectividad y sensibilidad, coste, disponibilidad, compatibilidad con el medio ambiente y capacidad de análisis. En la actualidad la cromatografía de gases (GC), la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), la Espectrofotometría de masas (ES), Espectrometría de masas (MS) y la Electroforesis capilar (CE) son las técnicas más utilizadas en el análisis de plaguicidas (Lehotay, 1998; Ravelo, 2009; Klein *et al.*, 2006) siendo las más importantes la GC y HPLC (Andreu y Picó, 2004). Estos métodos convencionales son complicados, requieren de reactivos caros, equipos muy sofisticados y su completo análisis tarda por lo general bastante tiempo (Tejada *et al.*, 1998).

Cromatografía de gases (GC)

Cuando la química comenzó a utilizarse con fines cuantitativos, apareció la necesidad de separar los diferentes componentes de una mezcla compleja para identificarlos y poder ser cuantificados, y siendo similares y muy parecidos la separación es más difícil, y la técnica de separarlos más compleja y casi nunca exitosa. La cromatografía fue descubierta por el

químico ruso Mikhail Tsuet al realizar un experimento pasando una mezcla de pigmentos orgánicos por una columna de alúmina y observo como se separaban en bandas de colores, por eso el nombre, se dio como una técnica de separación muy eficiente, y esa separación prosiguió con la cuantificación de los componentes de una muestra. Los dos factores en conjunto de lo que hay y cuanto hay han aportado enormemente al desarrollo de las técnicas cromatográficas. Este avance hubiera dejado de existir si no fue por el crecimiento y desarrollo paralelo de instrumentos apropiados y específicos aparte del conocimiento de variables experimentales que implementan la separación de un analito y su mejoría (Barquero, 2004). Los métodos para el análisis químico en general son selectivos en el mejor de los casos y pocos si es que los hay son verdaderamente específicos. A causa de esto la separación del analito de las posibles interferencias es a menudo una etapa de vital importancia en los procedimientos analíticos. Si a mediados del siglo XX, las separaciones analíticas se llevaban a cabo mediante procedimientos clásicos como precipitación, destilación y extracción, actualmente, a pesar de ello, las separaciones analíticas se realizan en la mayoría de los casos por cromatografía (Abelló, 2001). La cromatografía de gases (GC) ha sido una de las técnicas mas utilizadas en los laboratorios, tuvo una gran e inmediata repercusión ya que se requirieron instrumentos para su aplicación y esta se desarrollo gracias a la colaboración de químicos, ingenieros y físicos, y los análisis eran mas rápidos y se realizaban a pequeña escala; y con el desarrollo de la industria petrolera, debía mejorar el control analítico así que esta técnica se adoptó rápidamente y en unos pocos años se generalizo para analizar casi cualquier tipo de compuesto orgánico (Christian, 2007).

Esta técnica analítica permite separar mezclas de compuestos que son volátiles y térmicamente estables en sus componentes individuales. En las separaciones cromatográficas, la muestra se mueve con una fase móvil, a través de una fase estacionaria que no se mezcla que esta fijada a una columna o a una superficie sólida. Estas dos fases se seleccionan de forma que los componentes de la muestra se dispersen de modo diferente entre ambas, estos componentes fuertemente inmovilizados por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por otro lado, los componentes que se unen débilmente se mueven con rapidez. A causa de la diferente movilidad, los

componentes de la muestra se separan en bandas las cuales se identifican cualitativa y determinarse cuantitativamente. Como fase móvil en el empleo de esta técnica se utiliza un gas. En GC la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica, esto conlleva a que la muestra debe ser volátil y térmicamente estable. La elución se produce por el flujo de un gas inerte como He, N₂, H₂, aunque de acuerdo con el tipo de detector es necesario emplear gases específicos. Se encuentran dos tipos de cromatografía de gases: Cromatografía de gas líquido (GSL) la cual es la más utilizada en gases, y como fase estacionaria usan un líquido inmovilizado sobre un soporte sólido inerte, esta fase debe ser estable y no volátil a las temperaturas empleadas en el análisis, y de una naturaleza similar a las muestras que se desea separar en ella; Cromatografía de gas sólido (CGS) la fase estacionaria es un sólido el tipo de equilibrio con la fase móvil es una adsorción, esta es limitada a moléculas polares, la retención de las moléculas activas o polares no es permanente, se presentan puntas o colas (Barquero, 2006).

Olguín y Rodríguez (2004) hablan sobre la aplicación que esta técnica tiene en los análisis ambientales, los cuales se enfocan en la detección y/o cuantificación de un gran número de sustancias diferentes en una diversidad de modelos. Puede ser desde análisis químicos de pesticidas y herbicidas hasta hidrocarburos aromáticos polinucleares, compuestos clorados mezclados en el aire, agua y suelo. En la mayoría de los casos uno de los problemas principales es la obtención y preparación de la muestra. Las muestras de agua son muy variables, desde agua potable hasta aguas industriales. Por lo regular y en muchos casos las agencias de regulación de calidad tienen procedimientos estándar específicos para el análisis de materiales dados en una matriz dada. Los métodos de análisis oficiales son menos sensibles y consumen mucho tiempo más que los métodos que se desarrollaron a comienzos de la cromatografía. La agencia de protección ambiental (EPA) en Estados Unidos precisó procedimientos para el monitoreo de efluentes industriales en 1977. Algunos métodos como del 603 al 613 separan en 13 clases los 113 contaminantes orgánicos que son monitoreados por cromatografía de gases. Los análisis se efectúan en columnas tubulares abiertas, las cuales dan una precisión y tiempos de análisis cortos pese a la complejidad que tenga la muestra. Se utilizan fases estacionarias de compuestos aromáticos para mejorar la separación de los solutos. Estas mismas columnas son utilizadas para la separación de pesticidas y compuestos aromáticos clorados.

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Es una cromatografía de reparto tipo líquido-líquido, donde se puede reconocer una fase estacionaria conformada por un sólido recubierto por un líquido que por lo regular es polar como el agua y el etilenglicol y una fase móvil constituida por otro líquido que no es polar como el hexano, metanol y hexano/isopropanol; estos líquidos que forman las dos fases deben ser inmiscibles entre ellas (Silva y García, 2006). El HPLC (High Performance Liquid Chromatography) o Cromatografía líquida de alta resolución, esta técnica es utilizada en la separación de componentes con ayuda de una variedad de interacciones químicas entre el analito y la columna cromatográfica, principalmente este sistema está compuesto de un reservorio de fase móvil, bomba, inyector, columna de separación y detector. El analito pasa a través de una columna de la fase estacionaria bombeando la fase móvil líquida con alta presión, la muestra en pequeñas cantidades se introduce a la corriente de la fase móvil y ahí se prolonga o retarda por medio de interacciones químicas con la fase estacionaria conforme va pasando la columna. El retardo conocido también como tiempo de retención únicamente para el analito, esto depende de la naturaleza del analito, fase estacionaria y de la composición de la fase móvil. Lo que más se utiliza como solutos, comúnmente son combinaciones de agua purificada con líquidos orgánicos, como Metanol y Acetonitrilo, al igual que suelen usarse sales y buffers que ayudan a contribuir la separación de componentes. El gradiente de elución consiste en la variación de la composición de la fase móvil y así adaptarse a los distintos analitos y obtener mejores resultados. Para cada analito hay un gradiente de elución óptimo que es para obtener la máxima separación de picos en el detector (Aburra, 2007).

En la actualidad es la técnica más utilizada por su sensibilidad, adecuación para realizar determinaciones cuantitativas exactas y por su gran aplicabilidad a diferentes tipos de sustancias como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, fármacos, plaguicidas, antibióticos, especies organometálicos y sustancias inorgánicas (Alfonso, 2009).

Aburra (2007) describe 5 tipos de HPLC: Cromatografía de fase normal fue el primero que separaba analitos basándose en su polaridad, utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar, usándose cuando el analito es polar. El analito polar se retiene por la fase estacionaria polar, la adsorción incrementa con la polaridad del analito y la interacción entre el analito y fase estacionaria aumentando el tiempo de elución; la Cromatografía de fase inversa este tipo es el más común y se utiliza una fase estacionaria no polar y una fase móvil moderadamente polar; la Cromatografía de exclusión por tamaño conocida también como cromatografía de gel permeante o cromatografía de gel filtrante, y separa las partículas en función de su tamaño, es una cromatografía de baja resolución la cual sirve para determinar estructuras terciarias y cuaternarias de proteínas esto ayuda cuando se quiere conocer el peso molecular de polímeros sintéticos y naturales; la Cromatografía de intercambio iónico la cual se basa en que la retención se funda en la atracción entre iones del soluto y la carga complementaria de la fase estacionaria, cuando los iones del soluto y la fase estacionaria tienen la misma carga son excluidos; y la Cromatografía de bioafinidad donde las propiedades de sustancias bioactivas para formar complejos estables, específicos y reversibles, una unión bioespecífica se forma por la acción simultánea de esas fuerzas en los sitios de unión.

En los 80's fue cuando empezó a incrementarse el uso de esta técnica para su aplicación en el campo del análisis de residuos de plaguicidas, el cual ha crecido considerablemente. Ya que no era viable el análisis de plaguicidas por GC, se inició con HPLC, su aplicación y su uso ha aumentado en este campo gracias a los desarrollos que se han realizado en los sistemas de detección y en la tecnología de las columnas (Hogendoorn y Van, 2000). El avance que ha tenido en los análisis de plaguicidas se han centrado fuertemente en la obtención de separaciones más rápidas, de menor costo y mayor eficacia, con sus apropiadas sensibilidades y selectividades, también en el uso de fases móviles menos tóxicas para el medio ambiente y para el operador. Por eso se han realizado mejoras en las columnas, en los sistemas de bombeo y en los sistemas de detección.

Espectrofotometría de masas

Espectrofotómetro del latín: *spectrum*; imagen y de la griega *phos* o *photos*; luz, es un equipo que es capaz de producir luz monocromática y medir la cantidad de luz absorbida por una muestra. El método de análisis cuantitativo llamado espectrofotometría el cual consiste en la capacidad de las sustancias de absorber la luz, a determinada longitud de onda en proporción directa a la cantidad de materia presente. Por medio del espectrofotómetro se obtiene una medida del valor de la absorbancia de una muestra a una cierta longitud de onda. Una de las características que tienen los compuestos químicos es su coloración, su intensidad es muy utilizada en los ensayos bioquímicos. Para el ojo humano la luz visible captada ocupa una cantidad restringida del espectro electromagnético que va de los 400 nanómetros (nm) a los 800nm, para investigaciones bioquímicas se utilizan el espectro visible y el ultravioleta y abarca entre los 200 y 800nm. Y para poder cuantificar las reacciones coloridas se creó este instrumento los cuales están formados de 5 componentes que son: fuente luminosa o de luz la cual puede ser de tungsteno, infrarroja o luz ultravioleta, esto dependerá del espectro en que se trabajara; un monocromador para seleccionar la longitud de onda que incide sobre la muestra; cámara; celda o cubeta para colocar la muestra; detector para medir la intensidad de la luz transmitida y la unidad electrónica para capturar los datos (sistema de lectura). Al incidir el haz de luz de determinada longitud de onda sobre una muestra parte de esa luz es absorbida mientras que la otra parte es reflejada o transmitida, la cantidad de luz que es absorbida por la muestra es directamente proporcional a la concentración de la muestra que a mayor concentración mayor absorción y menos transmisión y a la longitud del cuerpo atravesado por el haz es el ancho de la cubeta. Se le conoce como la ley de Beer y Lambert a que la absorbancia depende directamente de la concentración de la sustancia dado que el coeficiente de extinción molar es una constante para cada sustancia y el diámetro de la cubeta también es fijo (Quesada, 2007; Gutierrez *et al*, 2016)

Espectrometría de masas (MS)

Este método comprende tres funciones: producir iones a partir de las moléculas a investigar, separar estos iones de acuerdo con la relación masa-carga y medir las abundancias relativas de cada ion. Antes se utilizaba para análisis cuantitativos de mezclas de hidrocarburos, no se tenía la seguridad de tener una conexión entre el espectro y la estructura, y fue que dejó de ser utilizado y no fue hasta finales de los años 50 que se demostró claramente el papel de los grupos funcionales sobre la fragmentación directa y se inició a desarrollar la capacidad de los espectrómetros de masas la cuantificación de estructuras orgánicas. Se ha perfeccionado tanto que ahora es uno de los primeros métodos al que se recurre por problemas estructurales, la gran ventaja es que se puede facilitar la obtención de información estructural con cantidades de material inferior a un miligramo o incluso a un microgramo (Pasto y Johnson, 2003). Este instrumento mide las masas de moléculas individuales transformadas a iones, no mide la masa molecular directamente, si no mide la relación masa/carga de iones formados de las moléculas. Tienen siete componentes mayores: un sistema de entrada, una fuente de iones, un analizador de masas, un detector, un sistema de vacío, un sistema de control y un sistema de datos. Junto con la fuente de iones, el sistema de entrada y el tipo de analizador de masas definen el tipo de espectrómetro y la capacidad del sistema. La composición de los instrumentos usados es una combinación de sistemas de entrada, fuentes de iones y analizadores de masas.

La espectrometría de masas es una imponente técnica microanalítica utilizada para la identificación de compuestos desconocidos, para determinar compuestos conocidos y para especificar estructuras y propiedades químicas de moléculas. En la técnica clásica de impacto electrónico, algunas de las moléculas ionizadas del analito estallan en una diversidad de fragmentos ionizados, el patrón de fragmentación resultante así como los iones residuales conforman el espectro de masas, cada compuesto es único y es llamado huella química para caracterizar el analito (Placencia, 2003).

El análisis de residuos mediante espectrometría de masas se realiza generalmente conjuntamente con una técnica cromatográfica de separación con el objetivo de obtener conjuntamente datos del tiempo de retención, la relación masa/carga en los iones y la abundancia de los mismos (Montoya, 2012).

Electroforesis capilar

El método consiste en la migración de moléculas cargadas a través de un medio por la acción de un campo eléctrico (Pilar et al, 2004). Las muestras se separan en un tubo capilar largo, de más o menos 50µm de diámetro y unos 50cm de longitud, relleno de sílice fundido con un tapón aplicándosele un voltaje elevado de 10 a 30Kv. La muestra se ubica en un extremo del capilar y se coloca un detector, por lo general en el otro extremo se utiliza un espectrofotómetro. Para la separación de los componentes de una muestra se basa principalmente en la carga, tamaño, hidrofobicidad y estereoespecificidad. El flujo electroosmótico es importante debido al intenso campo eléctrico, de modo que el movimiento del tapón arrastra hacia el cátodo todas las moléculas (González, 2010). Se utiliza ampliamente en la separación analítica de moléculas biológicas (Voet y Voet, 2006).

Esta técnica se ido mejorando con el tiempo, de manera que no únicamente se pueden separar las moléculas por su carga sino también por su tamaño, logrando así diferenciar moléculas con el mismo tipo de carga gracias al empleo de medios que permiten el cribado molecular. En la actualidad la electroforesis se ha mecanizado de una manera similar al HPLC, es por eso que tiene el nombre de electroforesis capilar, lo cual hace todo de manera automática (Pilar et al, 2004). Se pueden emplear volúmenes muy pequeños de tapón y de muestras, las condiciones analíticas se modifican fácilmente, se dice que es rápida, pocos minutos de duración. Se ha empleado para separar y cuantificar proteínas, ADN, iones, metabolitos principalmente, y cada vez ha ido ampliando su aplicación a diferentes campos, específicamente en el análisis medioambiental. Se ha demostrado que este método complementa a las técnicas habituales de análisis para la separación y determinación de clases químicas nocivas para el medio ambiente, ya sea contaminantes orgánicos e inorgánicos (González, 2010; Claire, 1996).

Para lograr analizar un plaguicida por medio de una de estas técnicas se deben incluir una serie de pasos o métodos de análisis previos, ya que contienen más sustancias, las cuales interfieren en su determinación. Debido a la complejidad de la naturaleza de las matrices

en que se encuentran los plaguicidas y a los LMR exigidos por los organismos reguladores, la preparación de la muestra debe ser eficiente como también la identificación y la detección, los cuales son aspectos sumamente importantes para su determinación que son: la extracción del plaguicida selectiva y cuantitativamente de la propia matriz de la muestra, anulando un gran número de posibles interferencias sin que haya errores en la medida analítica; preconcentrar los analitos, exclusivamente en casos que se encuentren a muy bajas concentraciones, intentando obtener factores de preconcentración elevados; favorecer la determinación de los plaguicidas, facilitando su separación y detección, esto se logra transformando los analitos en diferentes formas químicas, y esto se da en la mayoría de los casos; y limpieza o clean up la cual permitirá eliminar posibles interferencias de la matriz que lograrían impedir la correcta determinación de los analitos (Camara et al, 2002).

Estos métodos convencionales para detectar residuos de plaguicidas como se describieron, entre ellos hay grandes ventajas, pero en una sociedad cada vez más preocupada por los alimentos que se consumen, ya que muchos alimentos exceden los niveles de tolerancia reguladora, hay ciertas desventajas las cuales es importante tomar en cuenta, ya que no todos podemos tener acceso a este tipo de métodos tradicionales, los cuales son complicados, requieren de reactivos caros, equipos muy sofisticados y su completo análisis tarda por lo general mucho tiempo (Tejada et al, 1998) aparte la mano de obra tiene que ser alguien muy capacitado para manejar estos equipos y que es intensivo, los equipos además de ser caros requieren de mucho espacio en el laboratorio y se expone a los trabajadores y al medio ambiente a solventes peligrosos los cuales generan más cantidad de residuos peligrosos ya que ocurre una evaporación de disolventes por consecuencia una mezcla de estos (Lehotay, 1998).

El mismo autor menciona sobre la preocupación que hoy en día existe por los residuos de plaguicidas en los alimentos y en el medio ambiente que se ha convertido en un tema muy amplio el cual es principal objetivo de muchas investigaciones para crear nuevas tecnologías alternativas y que su visión sea general a los enfoques tradicionales. Por ello es importante crear nuevas metodologías analíticas que sirvan para detectar residuos de

plaguicidas las cuales sean rápidas, económicas y aplicables (González *et al.*, 2005). Tal es el caso de la técnica ELISA que está basada en anticuerpos monoclonales, sustratos y enzimas que se emplean en la detección y cuantificación rápida, específica y muy sensible de residuos de plaguicidas en alimentos y el ambiente.

Técnica de placas Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Esta técnica fue desarrollada por Engvall y Pesce en 1978, es ampliamente utilizada en la actualidad gracias a su simplicidad, a su rapidez, por su bajo costo y por su posibilidad de automatizar (Negroni, 2009). Se pueden encontrar diversos sistemas de ELISA para detectar antígenos o anticuerpos sin embargo todos los protocolos poseen en común el recubrimiento de una fase sólida la cual se le llama placa ELISA formada de poliestireno, con el antígeno o anticuerpo que son incubados con reactantes secundarios o terciarios acoplados covalentemente con una enzima, los conjugados desunidos son removidos por lavados, después se agrega un sustrato cromógeno o fluorogénico y el color o la fluorescencia originada se detecta visualmente o con la ayuda de un lector de placas para ELISA (Mendoza *et al.*, 2007). La prueba ELISA se apoya de varias teorías: el antígeno y anticuerpo pueden enlazarse a una superficie portadora insoluble reteniendo su actividad inmunológica; las enzimas poseen actividad específica alta y convierten una gran cantidad de sustrato en producto detectable, permitiendo una detección de concentración muy baja del ligado; su actividad enzimática o reactividad inmunológica de los conjugados se preserva y permanece estable durante el análisis y almacenamiento; y que las enzimas no están presentes en líquido biológico que se analizara (Guzmán, 2004).

Existen diversos tipos de ELISA: ELISA directa el cual es el más utilizado para cuando un anticuerpo específico y pequeñas cantidades de antígeno (mg) purificado o semipurificado están disponibles; ELISA indirecto se utiliza más para vigilar antiseros o sobrenadantes que contienen anticuerpos específicos cuando las cantidades del antígeno purificado o semipurificado están en gran proporción. En Elisa directa como en ELISA indirecto la porción que recubre más la placa de ELISA es el antígeno; ELISA tipo

sándwich es mucho más sensible que la ELISA directa e indirecta en la detección del antígeno donde los anticuerpos específicos para el antígeno son los que recubren la placa de poliestireno; también puede desarrollarse de manera sencilla en donde un anticuerpo conjugado reconoce al antígeno también conocido por el anticuerpo que recubre la placa, o puede crearse como doble sándwich en donde el anticuerpo que recubre la placa se une al antígeno, el cual es reconocido por otro anticuerpo que paralelamente es reconocido por otro anticuerpo conjugado con la enzima (Arce *et al*, 2007).

Este tipo de métodos son ampliamente utilizados en análisis de rutina como en investigaciones, generalmente en el área de Química, en Medicina, Microbiología, Medio Ambiente y en la industria alimentaria, ocupan el 90% del total de determinaciones efectuada (Gabaldón, 1999).

Como se mencionaba anteriormente que ya hay varias investigaciones desarrollando métodos en base a ELISA. Varios de estos trabajos se utilizan para determinar la presencia y cuantificación de diferentes tipos de pesticidas en varias muestras ambientales, alimentos y seres vivos. Y hasta se han creado kits comerciales en el mercado que utilizan esta técnica para determinar residuos de plaguicidas en diversos tipos de muestras (Crosa, 2006).

Método Ellman

Varias pruebas de inhibición de enzima se han realizado para detectar residuos de plaguicidas en alimentos y medio ambiente (agua, suelo) que se basan en la prueba de Ellman la cual presenta mayores ventajas por su sensibilidad, reproducibilidad, sencillez y fácil automatización, ya que puede aplicarse usando distintos sustratos, para ACE con acetilcolina y colinesterasa con butiriltilocolina, así mismo la ACE puede inhibirse añadiendo quinidina a la mezcla o reacción (Camean, 1995). Consiste en el insecticida reacciona directamente con la ACE, la tiocolina es liberada por hidrolisis, reacciona con un colorante ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), cuando la ACE es completa o parcialmente inhibida por el insecticida, la reacción del colorante baja su intensidad o se

detiene. El grado en que la reacción se presenta es como se mide la cantidad de los residuos de plaguicidas (Tejada, 1998).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas experimentales fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Toxicología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, durante el periodo agosto del año 2016 a junio de 2017.

La metodología empleada en esta investigación es la descrita por el Instituto de Investigación de Agricultura de Taiwán que se fundamenta en la inhibición de la enzima de Ellman (Ellman et al., 1961; Casarett y Doule, 1975) la cual consiste en la reacción de un insecticida con una enzima, en este caso la acetilcolinesterasa (ACE). Para la adaptación de la técnica se aplicó la metodología descrita por Brogdon (1998).

Se determinaron el tiempo óptimo de reacción (ToR) y la cantidad de sustrato saturante (css) del colorante ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), el sustrato Yoduro de acetilcolina (ATChI) y la enzima ACE. Y así determinar los niveles de la ACE.

La enzima utilizada fue sintética (acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus*), obtenida de una empresa, la cual se mantuvo en congelación a -20° mientras se procedía a realizar las pruebas.

Preparación de las concentraciones

Para realizar las concentraciones a evaluar, se preparó un Buffer KPO₄ con agua destilada (fosfato de potasio monobásico y fosfato de potasio dibásico) para el caso del DTNB; para el sustrato ATChI se utilizó el mismo buffer y se le agregó acetona; para la enzima ACE se preparó un buffer especial (Tris HCL) en agua destilada una solución a 20mM con un pH de 7.5.

Determinación del colorante ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB)

Se prepararon 4 concentraciones a evaluar 1, 2, 3 y 4Mm, usando como concentraciones constantes 1 uM de ACE y 1mM de ATCHi, se utilizó una microplaca con 96 pocillos, a cada cavidad se le colocaron 100uL de ACE y 100uL de ATCHi a esto se la agregaron 100uL del colorante, cada una de sus concentraciones con 24 repeticiones, se llevó la microplaca al lector de placas BioTek (Elx800) utilizando un filtro de 405 nm, donde se tomaron las lecturas de absorbancia de cada tiempo a intervalos de 3 hasta los 21 minutos.

Determinación del sustrato Yoduro de acetilcolina (ATCHi)

Las concentraciones evaluadas fueron 1, 2, 3, 4 y 5 Mm, con las concentraciones constantes de 4Mm DTNB y ACE 10Um, siguiendo el mismo método de la microplaca en donde las diferentes concentraciones del sustrato se repitieron 24 veces y también se tomaron las lecturas del minuto 3 al 21.

Determinación de la enzima acetilcolinesterasa (ACE)

Se evaluaron las concentraciones 1, 5, 10, 50, 100 y 500Um, con las concentraciones establecidas del DTNB (4Mm) y ATCHi (5Mm), al minuto 3, se siguió el mismo método de la microplaca, se repitieron 24 veces las concentraciones y se tomaron las lecturas de absorbancia.

Análisis de resultados

Las diferentes combinaciones de los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANVA) con 24 repeticiones, al indicar la existencia de diferencias significativas entre las combinaciones, se aplicó la prueba de LSD para la separación de medias. Se utilizó para cada uno de los análisis el programa SAS 9.4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB)

Los valores para el ToR (Cuadro 1) y css (Figura 1) se obtuvo al minuto 3 con la concentración 4mM visto que las lecturas de tiempos más altos bajan sus valores en las lecturas. Cerna (2010) en su trabajo de la adaptación de métodos de microplacas señala un css de 0.5m M con un ToR a los 15 min. estos valores difieren a los obtenidos en la presente investigación y puede deberse a que la fuente enzima utilizada no fue sintética, ya que las enzimas de origen sintético son menos estables. Por otro lado, Diaz (2006) reporto en su investigación adaptación de los métodos de cuantificación de la actividad acetilcolinesterasa en *Blatella germánica* una css de 50mM con un ToR de 30min. Como podemos observar en la figura 1 la curva va descendiendo del minuto 3 al 21 en las lecturas de absorbancia del colorante DTNB, esto es debido a la relación de la absorbancia entre la pendiente de los datos, por otro lado, en el cuadro 1, se observa que hubo diferencia estadística entre las diferentes concentraciones, pero se mantuvo estable a través del tiempo.

Cuadro 1. Tiempo óptimo de reacción para el colorante ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB).

DTNB	Tiempo						
	3	6	9	12	15	18	21
1mM	0.187 C	0.187 C	0.187 C	0.187 C	0.186 C	0.186 C	0.186 C
2mM	0.249 B	0.250 B					
3mM	0.273 B	0.276 B	0.278 B	0.278 B	0.279 B	0.279 B	0.280 B
4mM	0.455 A	0.456 A	0.455 A	0.456 A	0.456 A	0.456 A	0.457 A

Medias con la misma letra, no son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0.05$).

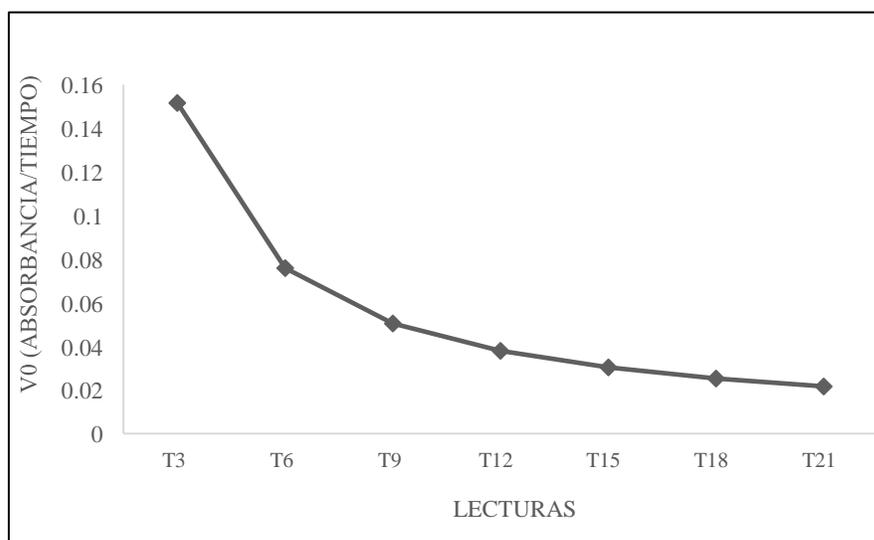


Figura 1. Cantidad de sustrato saturante para el colorante ácido 5,5'-ditio- bis-2 nitrobenzoico (DTNB).

Yoduro de acetilcolina (ATCh)

Se estableció un ToR a los 3 minutos (Cuadro 2) ya que se observa como después de este tiempo los valores de absorbancia tienden a ir decayendo. Para la css fue de 5mM (Figura 2) se aprecia como va llegando la curva en su mayor valor a esta concentración, Cerna en 2010 reportó una css de 3.0mM a un ToR al minuto 15 trabajando en la adaptación de métodos de microplacas, por otro lado, Brogdon y Barber (1987) mencionaron que se obtuvieron los valores más altos a una concentración de 2.6mM al minuto 10, en su investigación de ensayo de microplacas para inhibir ACE de mosquitos.

Cuadro 2. Tiempo óptimo de reacción para el sustrato Yoduro de acetilcolina (ATChi).

	Tiempo						
ATChi	3	6	9	12	15	18	21
1mM	0.494 BC	0.498 BA	0.501 BA	0.503 BA	0.503 BA	0.504 BA	0.504 BA
2mM	0.479 C	0.483 B	0.486 B	0.488 B	0.489 B	0.490 B	0.491 B
3mM	0.477 C	0.488 BA	0.494 BA	0.497 BA	0.500 BA	0.502 BA	0.503 BA
4mM	0.539 BA	0.540 A	0.544 A	0.545 A	0.547 A	0.548 A	0.549 A
5mM	0.5867 A	0.519 BA	0.514 BA	0.519 BA	0.522 BA	0.525 BA	0.528 BA

Medias con la misma letra, no son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0.05$).

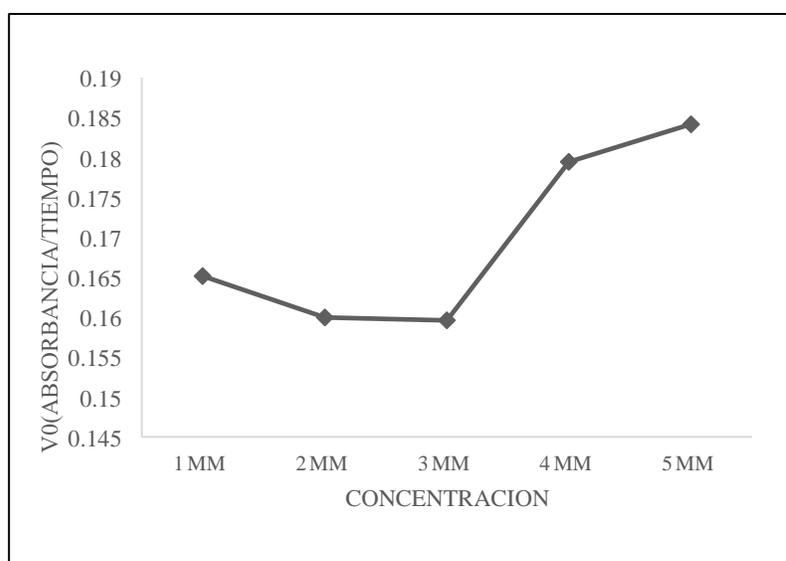


Figura 2. Cantidad de sustrato saturante para el sustrato Yoduro de acetilcolina (ATChi).

Acetilcolinesterasa (ACE)

En últimos resultados con los valores establecidos de ToR y css para DTNB y ATChi se obtuvieron la css para la enzima ACE (Cuadro 3) se distingue que el valor más alto de las concentraciones fue de 0.586 en el minuto 3; Al respecto Tejada (1998) menciona un

tiempo similar para inhibir la enzima, en una técnica rápida en la detección de residuos de plaguicidas. Como podemos observar al tiempo 3 fue donde se obtuvieron los valores más altos de absorbancia, así mismo en la figura 3, podemos observar que la concentración 10uM fue la que obtuvo el valor más alto de OD_{405} . Cantú en 2016 menciona que al minuto 5 obtuvo el valor máximo a una concentración de 0.005M. en su investigación al evaluar un método para la detección de plaguicidas .

Cuadro 3. Tiempo óptimo de reacción para la enzima Acetilcolinesterasa (ACE).

ACE	Tiempo						
	3	6	9	12	15	18	21
1uM	0.410 D	0.414 C	0.416 C	0.418 C	0.420 C	0.421 C	0.422 C
5uM	0.322 E	0.328 D	0.332 D	0.334 D	0.336 D	0.337 D	0.338 D
10uM	0.586 A	0.519 A	0.514 A	0.519 A	0.522 A	0.525 A	0.528 A
50uM	0.458 C	0.461 B	0.462 B	0.463 B	0.465 B	0.467 B	0.468 B
100uM	0.429 D	0.433 C	0.436 C	0.437 C	0.439 C	0.440 C	0.441 C
500uM	0.510 B	0.514 A	0.517 A	0.520 A	0.522 A	0.524 A	0.526 A

Medias con la misma letra, no son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0.05$).

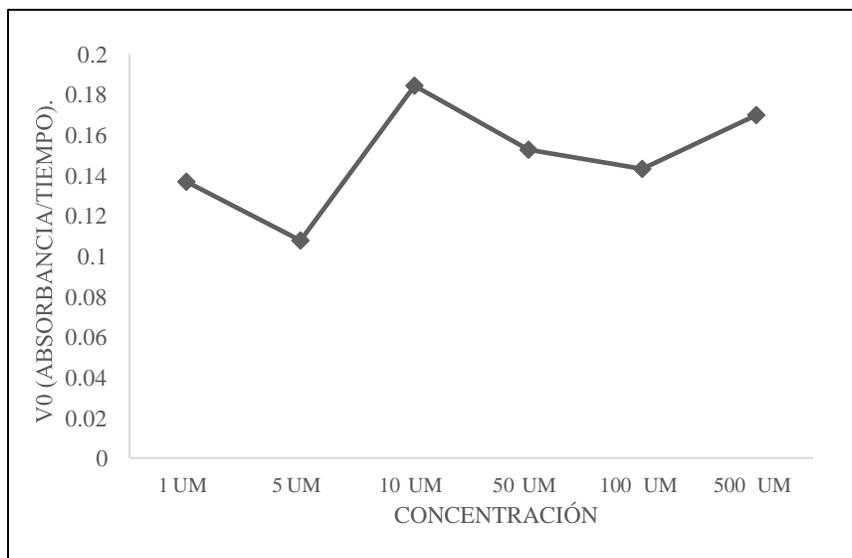


Figura 3. Cantidad de sustrato saturante para la enzima acetilcolinesterasa (ACE).

CONCLUSIÓN

Por todo lo descrito anteriormente podemos concluir que esta investigación es la base para emprender con una metodología rápida y eficiente para la detección de residuos de plaguicidas, aprovechando que los grupos químicos de los carbamatos y organofosforados reaccionan con la enzima acetilcolinesterasa y que esta se puede obtener de forma sintética y ser utilizada, relacionando la cantidad de insecticida en función al sustrato formado por la enzima.

REFERENCIAS

- ABBURRA, Rogelio. *Evaluación y control de los impactos generados por materiales y residuos no convencionales/Evaluation and control of the impacts generated by waste materials non-conventional*. Editorial Brujas, 2007. P.
- AGUILERA, Ana, et al. Supercritical fluid extraction of pesticides from a table-ready food composite of plant origin (gazpacho). *Journal of agricultural and food chemistry*, 2003, vol. 51, no 19, p. 5616-5621.
- ALFONSO, M, María. *Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y la acuicultura*. Universidad Santiago de Compostela, 2009.
- ANDREU, Vicente; PICÓ, Yolanda. Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2004, vol. 23, no 10, p. 772-789.
- BARQUERO, Q, Miriam. *Principios Y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases*. Editorial Universidad de Costa Rica, 2006. P. 56.
- BOLIVIA, Fundación Plaguicidas. Manual de diagnóstico tratamiento y prevención de intoxicaciones agudas por plaguicidas. En *Manual de diagnóstico tratamiento y prevención de intoxicaciones agudas por plaguicidas*. PLAGBOL, 2008.
- BROGDON, William G.; BARBER, Ann M. Microplate assay of acetylcholinesterase inhibition kinetics in single-mosquito homogenates. *Pesticide biochemistry and physiology*, 1987, vol. 29, no 3, p. 252-259.
- BROGDON, William G. Microassay of acetylcholinesterase activity in small portions of single mosquito homogenates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 1988, vol. 90, no 1, p. 145-150
- CABILDO, M. P; et al. *Bases químicas del medio ambiente*. Editorial UNED, 2013. P. 528.
- CAMEAN, Ana. *Toxicología avanzada*. Ediciones Díaz de Santos, 1995. P. 636.
- CASARETTE, L. J.; DOULL, J. Toxicology, the basic sciences of poisons Macmillan Publishing. *New York*, 1980.

- CANTÚ, H., Gómez, A., Aguilera, C., Rodríguez, J., Núñez, A. Evaluación de un método para la detección de plaguicidas anticolinesterasa en subproductos de la refinación de aceite vegetal. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2016. Vol. 1, No. 1: 116-121.
- CERNA, Ernesto, et al. Adaptación de métodos en microplacas para identificar mecanismos de resistencia en *Tetranychus urticae* Koch. *Agrociencia*, 2010, vol. 44, no 6, p. 623-630.
- CHRISTIAN, D, Gary. *Analytical Chemistry*, 6th ED. Wiley India Pvt. Limited, 2007. P. 856.
- COFEPRIS (2010) Plaguicidas y Fertilizantes 2015. Consulta: 25 agosto 2017. Disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/PlaguicidasYFertilizantes.aspx>
- ELLMAN, George L., et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 1961, vol. 7, no 2, p. 881-905.
- FERNÁNDEZ, Ana María CAMEAN; JIMÉNEZ, Manuel REPETTO. *Toxicología alimentaria*. Ediciones Díaz de Santos, 2012.
- FISHEL, Frederick M. *Pesticidas y Colinesterasa*. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville. 2012.
- GARCIA, IGNACIO, S. Identificación de los productos y medios empleados para el control de plagas-UF1503. España. Ediciones Paraninfo, S.A. 2017. P. 233.
- GARCÍA, MJ., SILVA, MC. Papel técnico de laboratorio de análisis clínico en bioquímica. 2006.P. 234.
- GONZÁLEZ-RUMAYOR, Victor, et al. Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. *CEIM/Dirección General de Universidades e Investigación*, 2005.P. 113.
- GIL, H. A. *Tratado de nutrición/Nutrition Treatise: Composición Y Calidad Nutritiva De Los Alimentos/Composition and Nutritional Quality of Foods*. Ed. Médica Panamericana, 2010. P. 812.

- GUTIÉRREZ, Jorge A., et al. Residuos de plaguicidas organoclorados, organofosforados y análisis fisicoquímico en piña (*Ananas comosus* L.). *Agro sur*, 2010, vol. 38, no 3, p. 199-211.
- GUTIÉRREZ VENEGAS, Gloria, et al. Prácticas de bioquímica. Universidad Nacional Autónoma de México. 13ª Edición. 2016. P. 201.
- HOGENDOORN, Elbert; VAN ZONEN, Piet. Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis. *Journal of Chromatography A*, 2000, vol. 892, no 1, p. 435-453.
- KLEIN, Christine, et al. Enantiomeric separation of metolachlor and its metabolites using LC-MS and CZE. *Chemosphere*, 2006, vol. 62, no 10, p. 1591-1599.
- LEHOTAY, Steven J. *New Technologies Applied in Pesticide Residue Analysis*. Residuos de Plaguicidas, 1998, vol. 96, p. 53.
- MANAHAN, S. E. Introducción a la química ambiental. Editorial Revérte, UNAM, México. Pág, 789.2007.
- MENDOZA, Alma Yolanda Arce; TARACO, Adrián Geovanni Rosas; TOVAR, Luis Edgar Rodríguez. *Prácticas de inmunología general aplicada y veterinaria*. Editorial El Manual Moderno, 2007.
- MONTOYA PAVI, Sergio Alejandro, et al. *Documentación de la técnica de cromatografía de gases en el análisis de hidrocarburos alifáticos en aguas residuales*. 2012. Tesis Doctoral. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.
- NEGRONI, Marta. Microbiología Estomatológica Panamericana. 2009.
- OLGUÍN, L.; RODRÍGUEZ, H. M. Métodos en Biotecnología; cromatografía de gases. *Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México*, 2004.
- PASTO, Daniel J.; JOHNSON, Carl R. *Determinación de estructuras orgánicas*. Reverté, 2003.
- PÉREZ, Lidia María Ravelo. *Metodologías analíticas alternativas para la determinación de plaguicidas en aguas y productos agroalimentarios*. Universidad de La Laguna, 2009.
- PÉREZ, Eliana. *Determinación de plaguicidas organoclorados en agua de pozos adyacentes a zonas agrícolas mediante GC-MS*. 2011. Tesis de Licenciatura.

PLASCENCIA, G. Espectrometría de masas. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca. 2003.

SÁNCHEZ-CHÁVEZ, G; Salceda, R. Enzimas Polifuncionales: El caso de la acetilcolinesterasa. *REB*, 2008, vol. 27, no 2, p. 44-51.

TEJADA, A. W., et al. Enzyme Inhibition and Other Rapid Techniques for Pesticide Residue Detection. *Seeking Agricultural Produce Free of Pesticide Residues*, 1998.

VOET, Donald; VOET, Judith G. *Bioquímica*. Ed. Médica Panamericana, 2006.

ARTICULO CIENTIFICO

ADAPTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRÍA PARA LA DETECCIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS.

**Irasema del Rosario Malacara Herrera[&], Ernesto Cerna Chávez, Yisa Maria Ochoa Fuentes,
Jerónimo Landeros Flores, Dino Ulises González Uribe y Luis Alberto Aguirre Uribe.**

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Parasitología. Calzada Antonio Narro # 1923. Buenavista, Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México. C.P. 25315. Tel: (844) 41103-26. jabaly1@yahoo.com; yisa8a@yahoo.com; jlanflo@hotmail.com; digon_mx@yahoo.com; luisaguirre@yahoo.com [&]Autor para correspondencia: anir_chema@hotmail.com

Resumen

Existen métodos convencionales de detección de residuos de plaguicidas que son complejos, requieren de reactivos caros, equipos sofisticados y su análisis completo tarda mucho tiempo, tal es el caso de la técnica HPLC, la cromatografía de gases y la espectrofotometría de masas. Caso contrario ocurre con la técnica ELISA la cual se emplea en la detección y cuantificación rápida, específica y muy sensible de residuos de plaguicidas en alimentos y el ambiente teniendo como limitante la producción de anticuerpos, en específico la enzima acetilcolinesterasa para realizar la técnica. Sin embargo, la acetilcolinesterasa, se puede obtener sintéticamente, esta enzima puede ser inhibida por un grupo específico de insecticidas que son los organofosforados y carbamatos los cuales después de su aplicación siguen siendo tóxicos. Por lo anterior, se

determinó el tiempo óptimo de reacción y la cantidad de sustrato saturante de la enzima acetilcolinesterasa, el colorante ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico y el sustrato yoduro de acetilcolina. Donde se determinó que al minuto 3 el colorante reacciona a una concentración de 4mM, la enzima bajo el mismo tiempo y a una concentración de 10uM, y finalmente el sustrato a una concentración de 5mM. Estos resultados ayudarán en futuros trabajos a realizar las pruebas donde se haga reaccionar con insecticidas organofosforados y carbamatos en muestras de frutas y verduras para poder relacionar la cantidad de insecticida en función de la enzima acetilcolinesterasa contenida en las muestras.

Palabras clave: *Acetilcolinesterasa, ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico, yoduro de acetilcolina y ELISA.*

Abstract

There are conventional methods of detection of pesticide residues which have a complex methods, those methods require expensive reagents, sophisticated equipment and the complete analysis takes a long time to accomplish a result, such as the HPLC technique, gas chromatography and mass spectrophotometry.

Otherwise, the ELISA technique, who is a specific and sensitive methodology, is used to detect the rapid quantification of the residues of pesticides in food and the environment with the limitation of the production of antibodies, in particular case of the enzyme acetylcholinesterase in order to perform this technique. However, the acetylcholinesterase, can be obtained synthetically, this enzyme can be inhibited by a specific group of insecticides which are the organophosphates and the carbamates which after its application remain toxic. Therefore, the optimum reaction time was determined

and the amount of saturating substrate of the enzyme acetylcholinesterase as well, also the concentration of the acid colorant 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic and the acetylcholine iodide substrate its known. It was determined that at the minute 3, the colorant reacts whit a concentration of 4mM, the enzyme also react under at the same time but whit a concentration of 10uM, and finally the substrate reacts whit a concentration of 5mM. These results will help in future work to perform tests where it is reacted with organophosphate and carbamate insecticides in samples of fruits and vegetables, to relate the amount of insecticide based on the acetylcholinesterase enzyme contained in the samples.

Key words: *Acetylcholinesterase, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, acetylcholine iodide and ELISA.*

Introducción

La determinación de residuos de plaguicidas en alimentos, cada vez es más importante para los consumidores. (Aguilera *et al.*, 2003). Hay una creciente preocupación por los residuos en los alimentos a consecuencia del uso excesivo (Tejada *et al.*, 1998). La aplicación del desarrollo de nuevas tecnologías en el análisis de plaguicidas en los alimentos y el medio ambiente ha afectado la manera en que se perciben y utilizan los plaguicidas (Lehotay, 1998).

El método convencional en la detección de residuos de plaguicidas, es muy complicado y requiere de reactivos caros, equipos sofisticados y su análisis completo normalmente tarda mucho tiempo (Tejada *et al.*, 1998). Tal es el caso del HPLC, el cual se utiliza para separar e identificar compuestos en base a su polaridad; Por otro lado la cromatografía de gases puede ser utilizada para separar compuestos orgánicos basada en sus volatilidades; La Espectrofotometría de masas en donde las moléculas ionizadas de la muestra explotan en una variedad de fragmentos, el patrón de fragmentación constituyen el espectro de masas, este espectro es único y puede ser usado como su “huella química” para caracterizar el compuesto (Lehotay, 1998). Por esta razón es importante crear una nueva metodología analítica que nos sirva para detectar residuos de plaguicidas más rápida, económica y aplicable (Gutiérrez *et al.*, 2010).

Tal es el caso de la técnica ELISA que está basada en anticuerpos monoclonales, sustratos y enzimas que se emplean en la detección y cuantificación rápida, específica y muy sensible de residuos de plaguicidas en alimentos y el ambiente (González *et al.*, 2005). Por lo que la enzima Acetilcolinesterasa (ACE) que se encuentra en el neurosistema de los insectos y otros animales puede ser inhibida por un grupo específico de insecticidas que son los organofosforados y carbamatos que son extremadamente tóxicos después de

la aplicación (Tejada et al., 1998). Existen fuentes de esta enzima que se puede obtener sintéticamente, de los grupos de las colinesterasas de vertebrados es la colinesterasa verdadera, la cual su estructura molecular de la ACE se estableció para el órgano eléctrico de la anguila (*Electrophorus electricus*), y es válida para todos los tejidos y especies estudiados las cuales son capaces de catalizar reacciones químicas como las enzimas verdaderas (Sánchez y Salceda, 2008).

Por lo anterior se realizó una adaptación a la técnica ELISA basada en anticuerpos monoclonales con el objetivo de utilizar la enzima acetilcolinesterasa (ACE) como un indicador de residuos de plaguicidas para crear una nueva técnica más eficiente y económica.

Materiales y Métodos

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Toxicología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. La metodología utilizada en este trabajo fue descrita en el Instituto de Investigación de Agricultura de Taiwán basándose en la prueba de inhibición de la enzima de Ellman (Ellman *et al.* 1961; Casarett y Doule, 1975) la cual consiste en que un insecticida reaccione directamente con la enzima (ACE), esta fue obtenida de forma sintética (acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus*) de la empresa Sigma, la cual se mantuvo a -20°C antes de su utilización. Para la adaptación de la técnica se siguió la metodología descrita por Brogdon (1998), para determinar los niveles de la acetilcolinesterasa (ACE) se probaron diferentes concentraciones y tiempos. Para esto se determinaron el tiempo óptimo de reacción (ToR) y la cantidad de sustrato saturante para el colorante ácido 5,5'-

ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), el sustrato Yoduro de acetilcolina (ATChI) y la enzima ACE.

En el caso del colorante DTNB, las concentraciones evaluadas fueron 1, 2, 3, 4 mM a intervalos de 3 hasta 21 minutos, tomando la lectura de cada tiempo y utilizando como concentraciones constantes la de 1uM de ACE y 1mM de ATChI, se empleó una microplaca con 96 pocillos, en donde a cada cavidad se le colocaron 100uL de ACE y 100uL de la ATChI y se le agregaron 100uL del colorante DTNB en donde cada una de sus concentraciones se repitió 24 veces, se tomaron las lecturas de absorbancia utilizando un filtro de 405nm a los diferentes tiempos, donde se determinó la concentración de sustrato saturante (css) y el tiempo óptimo de reacción (ToR). Obteniendo como css del DTNB de 4Mm y el ToR de 3. Con lo anterior se procedió a obtener la css y el ToR de la ATChI, las concentraciones evaluadas fueron 1, 2, 3, 4 y 5mM manteniendo constante la concentración del DTNB (4mM) y la de ACE (10uM), siguiendo el mismo método de la microplaca, en donde las concentraciones de la ATChI se repitieron 24 veces y se tomaron las lecturas del minuto 3 al 21. Una vez determinadas la css y el ToR del DTNB y de ATChI se procedió a determinar la cantidad de ACE, evaluando las concentraciones de 1uM, 5uM, 10uM, 50uM, 100uM y 500uM.

Los resultados registrados para cada una de las combinaciones fueron sometidos a un análisis de varianza (ANVA) con 24 repeticiones cuando el ANVA indico la existencia de diferencias significativas entre las combinaciones, se aplicó la prueba de LSD para la separación de medias. Para cada uno de los análisis se utilizó el programa SAS 9.4.

Resultados y Discusión

Los valores del DTNB para el ToR (Cuadro 1) y css (Figura 1) fue al minuto 3 con la concentración 4mM dado que las lecturas de tiempos más altos bajan sus valores en las lecturas. Cerna en 2010 en su trabajo de la adaptación de métodos de microplacas menciona un css de 0.5Mm con un ToR a los 15 min. estos valores difieren a los obtenidos en la presente investigación y puede deberse a que la fuente enzima utilizada no fue sintética, ya que las enzimas de origen sintético son menos estables. Como podemos observar en la figura 1 la curva va descendiendo del minuto 3 al 21 en las lecturas de absorbancia del colorante DTNB, esto es debido a la relación de la absorbancia entre la pendiente de los datos, por otro lado, en el cuadro 1, podemos observar que hubo diferencia estadística entre las diferentes concentraciones pero se mantuvo estable a través del tiempo.

Cuadro 1. Tiempo óptimo de reacción para el colorante ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB).

DTNB	Tiempo						
	3	6	9	12	15	18	21
1mM	0.187 C	0.187 C	0.187 C	0.187 C	0.186 C	0.186 C	0.186 C
2mM	0.249 B	0.250 B					
3mM	0.273 B	0.276 B	0.278 B	0.278 B	0.279 B	0.279 B	0.280 B
4mM	0.455 A	0.456 A	0.455 A	0.456 A	0.456 A	0.456 A	0.457 A

Medias con la misma letra, no son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0.05$).

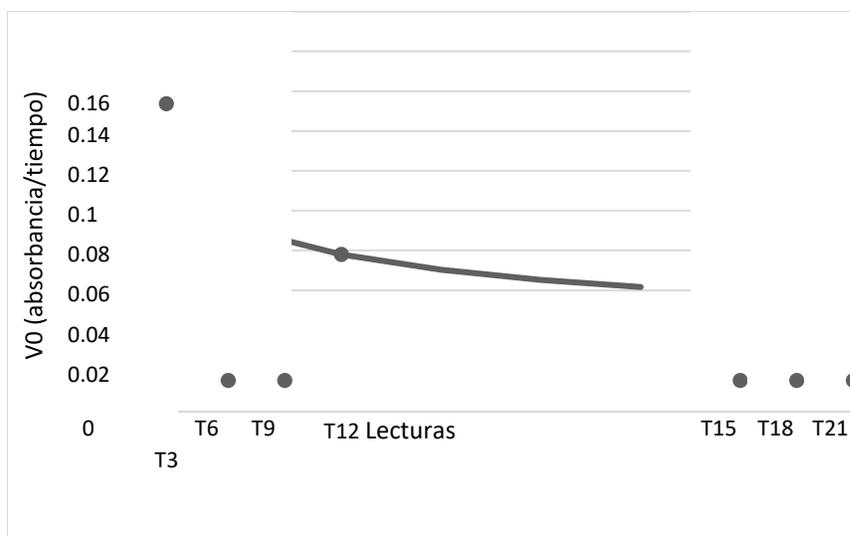


Figura 1. Cantidad de sustrato saturante para el colorante ácido 5,5'-ditio-bis-2 nitrobenzoico (DTNB).

Para la ATChi, el ToR establecido fue a los 3 minutos (Cuadro 2) ya que como podemos observar después de este tiempo los valores de absorbancia tienden a decaer. Para la css fue de 5mM (Figura 2) se distingue como la curva llega a su mayor valor a esta concentración, Cerna en 2010 reportó una css de 3.0mM a un ToR al minuto 15 trabajando en la adaptación de métodos de microplacas, por otro lado Brogdon y Barber (1987) mencionaron que a los 10 minutos se obtuvieron los valores más altos a una concentración de 2.6mM en su investigación de ensayo de microplacas para inhibir ACE de mosquitos.

Cuadro 2. Tiempo óptimo de reacción para el sustrato Yoduro de acetilcolina (ATChI).

ATChI	Tiempo						
	3	6	9	12	15	18	21
1mM	0.494 BC	0.498 BA	0.501 BA	0.503 BA	0.503 BA	0.504 BA	0.504 BA
2mM	0.479 C	0.483 B	0.486 B	0.488 B	0.489 B	0.490 B	0.491 B
3mM	0.477 C	0.488 BA	0.494 BA	0.497 BA	0.500 BA	0.502 BA	0.503 BA
4mM	0.539 BA	0.540 A	0.544 A	0.545 A	0.547 A	0.548 A	0.549 A
5mM	0.5867 A	0.519 BA	0.514 BA	0.519 BA	0.522 BA	0.525 BA	0.528 BA

Medias con la misma letra, no son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0.05$).

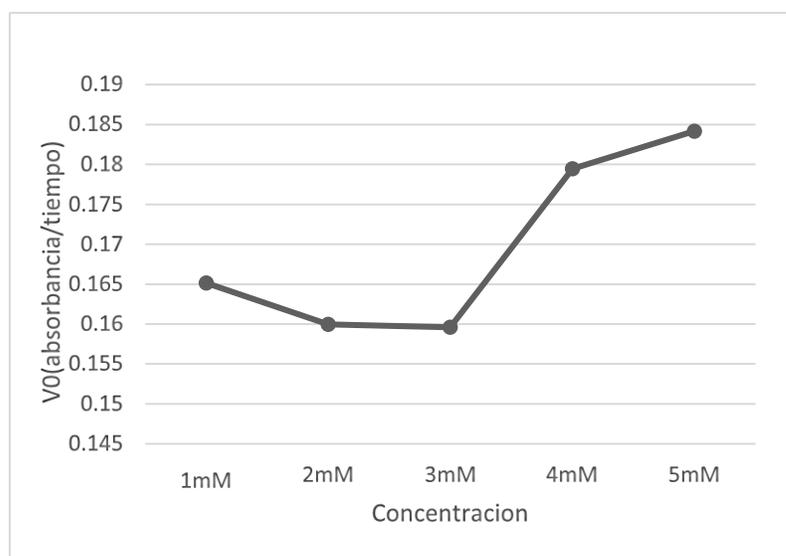


Figura 2. Cantidad de sustrato saturante para el sustrato Yoduro de acetilcolina (ATChI).

Finalmente con los valores establecidos de ToR y css para DTNB y ATChI se determinó la css para la enzima ACE (Cuadro 3) donde el valor más alto de las concentraciones fue de 0.586 en el minuto 3; Al respecto Tejada (1998) menciona un tiempo similar para

inhibir la enzima, en una técnica rápida en la detección de residuos de plaguicidas. Como podemos observar al tiempo 3 fue donde se obtuvieron los valores más altos de absorbancia, así mismo en la figura 3, podemos observar que la concentración 10uM fue la que obtuvo el valor más alto de *css*. Cantú (2016) indicó en su investigación al evaluar un método para la detección de plaguicidas donde la ACE al minuto 5 obtiene el valor máximo a una concentración de 0.005M.

Cuadro 3. Tiempo óptimo de reacción para la enzima Acetilcolinesterasa (ACE).

Medias con la misma letra, no son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0.05$).

ACE	Tiempo						
	3	6	9	12	15	18	21
1uM	0.410 D	0.414 C	0.416 C	0.418 C	0.420 C	0.421 C	0.422 C
5uM	0.322 E	0.328 D	0.332 D	0.334 D	0.336 D	0.337 D	0.338 D
10uM	0.586 A	0.519 A	0.514 A	0.519 A	0.522 A	0.525 A	0.528 A
50uM	0.458 C	0.461 B	0.462 B	0.463 B	0.465 B	0.467 B	0.468 B
100uM	0.429 D	0.433 C	0.436 C	0.437 C	0.439 C	0.440 C	0.441 C
500uM	0.510 B	0.514 A	0.517 A	0.520 A	0.522 A	0.524 A	0.526 A

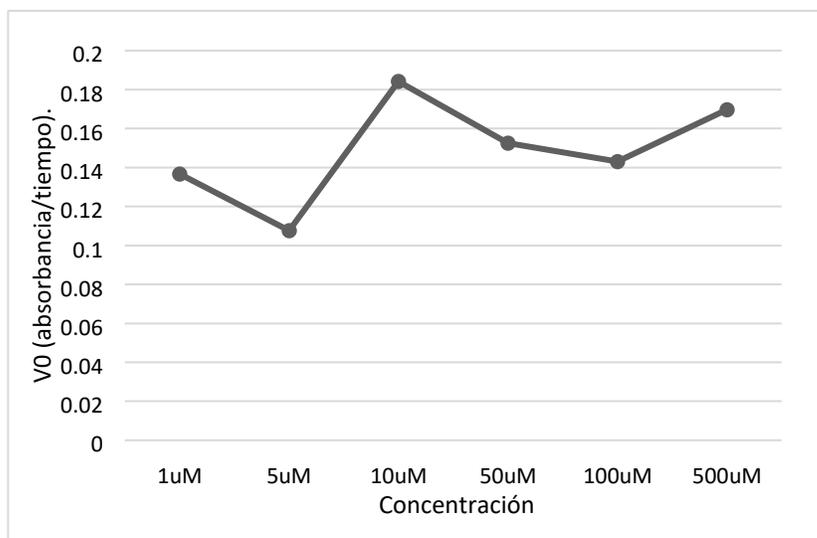


Figura 3. Cantidad de sustrato saturante para la enzima acetilcolinesterasa (ACE).

Conclusión

Por lo anterior podemos mencionar que este trabajo es la base para iniciar con una metodología rápida y eficiente para la detección de residuos de plaguicidas, en los grupos químicos de los carbamatos y organofosforados, aprovechando su reacción con la enzima acetilcolinesterasa y que esta se puede obtener de forma sintética y ser utilizada, pudiendo relacionar la cantidad de insecticida en función al sustrato formado por la enzima.

Literatura Citada

- Aguilera, A., Brotons, M., Rodriguez, M and Valverde, A. 2003. Supercritical Fluid Extraction of Pesticides from a Table-Ready Food Composite of Plant Origin (Gazpacho). *J. Agricultural and Food Chemistry*. 51: 5616-5621.
- Brogdon, W. G., and Barber, A. M.1987. Microplate assay of acetylcholinesterase inhibition kinetics in single-mosquito homogenates. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 29: 252-259.
- Brogdon, W. G. 1998. Microassay of acetylcholinesterase activity in small portions of single mosquito homogenates. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 90: 145-150.
- Cantú, H., Gómez, A., Aguilera, C., Rodríguez, J., Núñez, A. 2016. Evaluación de un método para la detección de plaguicidas anticolinesterasa en subproductos de la refinación de aceite vegetal. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Vol. 1, No. 1: 116-121.
- Casarett, L. and Doull, J. 1975. *Toxicology, the basic science of poisons*. McMillan Publishing Co., Inc. 63p.
- Cerna, E., Ochoa, Y., Badii, M., & Landeros, J.2010. Adaptación de métodos en microplacas para identificar mecanismos de resistencia en *Tetranychus urticae* Koch. *Agrociencia*. 44(6), 623-630.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. Jr. and Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7: 88–95.

- Gutiérrez, J. A., Pinzón, M. I., & Londoño, A. 2010. Residuos de plaguicidas organoclorados, organofosforados y análisis fisicoquímico en piña (*Ananas comosus L.*). *Agro Sur*. 38(3), 199-211.
- González, V., Iglesias, E. G., Galán, O. R., & Cabezas, L.G. 2005. Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. CEIM/Dirección General de Universidades e Investigación. 119pp.
- Sánchez, G., & Salceda, R. 2008. Enzimas Polifuncionales: El caso de la acetilcolinesterasa. *REB*. 27(2), 44-51.
- Lehotay, S. J. 1998. New Technologies Applied in Pesticide Residue Analysis. *Residuos de Plaguicidas*. 96, 53.
- Tejada, A. W., Varca, L. M., Calumpang, S. M. F., & Bajet, C. M. 1998. Enzyme Inhibition and Other Rapid Techniques for Pesticide Residue Detection. Seeking Agricultural Produce Free of Pesticide Residues. p 223-228.