

Validación de un método para la determinación de insecticidas organofosforados en hojas y tallos de guayabo (*Psidium guajava* L.), usando extracción ultrasónica y limpieza en fase sólida

Determination method validation of organophosphorus insecticides in leaves and stems of guava (*Psidium guajava* L.) using ultrasonic extraction and solid phase cleanup

G. Ettiene^{1*}, P. García², R. Bauza³, D. Medina¹ y L. Sandoval⁴

¹Departamento de Química. Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia. ²Departamento de Ingeniería, Suelos y Aguas. Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia. ³Departamento de Química. Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. ⁴Instituto de Investigaciones Agronómicas. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia.

Resumen

Se validó un método de análisis para la determinación de residuos de los insecticidas organofosforados (OPs) malatión y clorpyrifos en hojas y tallos de tres tipos de guayabo (*Psidium guajava* L): Criolla Roja, Tamare y Brasileira, basado en la extracción con ultrasonido y limpieza de los extractos en fase sólida. La eficiencia del método se evaluó calculando porcentajes de recuperación, mediante la adición de concentraciones conocidas de los OPs (0,025-0,25 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a 2,0 g de muestra de hojas y tallos de los tres tipos de guayabo, libre de residuos de insecticidas. La cuantificación se realizó por cromatografía de gases con detección nitrógeno-fósforo. El tiempo óptimo de extracción en el ultrasonido fue 6min. La fase sólida carbón grafitado (200,0 mg) permitió la obtención de altos porcentajes de recuperación (>85%) y extractos traslucidos. Se observaron diferencias significativas ($P<0,05$) para los valores medios de recuperación de los diferentes niveles de concentración en las muestras de hojas y tallos de Criolla Roja-Brasileira y Criolla Roja-Tamare. No se observaron diferencias significativas ($P>0,05$) en la

recuperación de Brasilera-Tamare en las muestras de hojas y tallos. El método de extracción propuesto mostró una alta precisión (RSD<0,2%) y bajos límites de detección (0,0147-0,0213 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) para los tres tipos de guayabo.

Palabras clave: Clorpirifos, malation, extracción ultrasónica, limpieza en fase sólida, organofosforados, determinación de insecticidas.

Abstract

A method was validated for the analysis and determination of organophosphorus insecticides (OPs) malathion and chlorpyrifos in leaves and stems of three types of guava (*Psidium guajava* L.): tree "Red Creole", "Tamare" and "Brazilian", based on the ultrasonic extraction and solid phase cleanup. The method efficiency was evaluated with calculation of recovery percentages, through the addition of known organophosphorus concentrations (0.025- 0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) to 2.0 g sample of stems and leaves of three types of guava tree, free of insecticides residues. The quantification was made by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. The best time for the ultrasonic extraction was 6 minutes. The solid phase, graphitized Carbon Black (200.0 mg) allowed high recovery percentages (>85%) and translucent extracts. Significant differences ($P<0.05$) were observed for the recovery means values of the different concentration levels in stems and leaves samples between "Red Creole" and "Brazilian", and "Red Creole" with "Tamare". Significant differences ($P<0.05$) were not found on the recovery of "Brazilian" and "Tamare" stem and leaves. The extraction method proposed showed a high precision (RSD<0.2%) and low detection limits (0.0147-0.0213 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) for the three guava types.

Key words: Chlorpyrifos, malathion, ultrasonic extraction, solid phase cleanup, organophosphorus.

Introducción

El estado Zulia contribuye con el ochenta por ciento de la producción nacional del fruto del guayabo, este cultivo es tratado con insecticidas organofosforados (OPs) para contrarrestar el efecto producido por la mota blanca del guayabo, *capulinia sp*, el cual es un insecto chupador que forma sus colonias en el tallo y las ramas de la planta causando la muerte de la misma (Chirinos *et al.*, 1999). De esta planta, además del fruto se utilizan la corteza del tallo (Ross, 1999) y las ho-

Introduction

Zulia state contribute with 80% of national production of guava fruit, this crop is treated with organophosphorus insecticides (OPs) to counteract the effect produced by the guava cottony scale, *Capulinia sp*, which is a sucking insect that form its colonies on stem and branches of plant causing its dead (Chirinos *et al.*, 1999). From this plant, besides of fruit the stem cortex (Ross, 1999) and leaves (Lozoya *et al.*, 1994; Meian and Mohamed., 2001) are used, because

jas (Lozoya *et al.*, 1994; Meian y Mohamed., 2001) los cuales contienen flavonoides. Estos polifenoles podrían ser los responsables del efecto anticolinérgico gastrointestinal que le confiere al guayabo una actividad antidiarreica inespecífica (Gutiérrez *et al.*, 2000), la cual ha permitido la proliferación del uso de la misma como planta medicinal (Rodríguez *et al.*, 1999).

Vargas *et al.*, (2006), identificaron tres flavonoles (miricetina, quercetina y kaempferol) y dos flavonas (luteolina y apigenina) en corteza, hoja inmadura, hoja madura, hoja senescente, botón floral, flor y fruto de guayaba (*Psidium guajava* L), determinaron que quercetina es el flavonoide más abundante en todos los órganos, excepto en la corteza donde miricetina resultó ser el más abundante. Concluyen que las hojas maduras son los órganos más convenientes para la extracción de flavonoides en árboles de guayabo y sugieren la posibilidad de aprovechar los restos de follaje de la poda para la extracción comercial de flavonoides. Sin embargo, esta alternativa sólo podría ser considerada si se realiza un análisis de residuos de OPs, antes de la extracción de los flavonoides con fines medicinales, ya que puede existir un riesgo de contaminación si hay presencia de residuos y provocar una posible intoxicación de los consumidores. En consecuencia, se crea la necesidad de validar métodos de análisis de residuos de OPs que permitan garantizar la inocuidad de hojas y tallos de guayabo.

La extracción de OPS con disolventes orgánicos es una técnica tradicional en la cual se ha empleado

they have flavonoids. These polyphenols could be responsible of the digestive system anticholinergic effect that gives guava an anti-diarrheic unspecific activity (Gutiérrez *et al.*, 2000) which have permit the proliferation of its use as medicinal plant (Rodríguez *et al.*, 1999).

Vargas *et al.*, (2006), identified three flavonols (miricetin, quercetin and kaempferol) and two flavons (luteoline and apigenine) in cortex, immature leaf, mature leaf, senescent leaf, floral bud, flower and fruit guava (*Psidium guajava* L.), determined that quercetine is the more abundant flavonoid in all the organs, except in cortex where miricetine was the more abundant. They concludes that mature leaves are the more convenient organs for the flavonoids extraction in guava trees and suggest the possibility of taking advantage of the pruning foliage rest for the commercial extraction of flavonoids. However, this alternative only could be considered if an analysis of OPs residues is accomplished before the flavonoids extraction with medicinal purposes, because it is possible to have a contamination risk if there is residues presence and cause a possible intoxication of consumers. As a consequence, there is necessary to validate OPs residues analysis methods that permit to guarantee the guava leaves and stems harnessless.

The OPS extraction with organic solvents is a traditional technique in which a wide number of organic solvents have been used, because there is no consent between different countries to propose an only procedure (Pico *et al.*, 2003). Between more used solvents it is possible to detach, ethyl

un amplio número de disolventes orgánicos, ya que no hay consenso entre los diferentes países para proponer un procedimiento único (Pico *et al.*, 2003). Entre los solventes de mayor uso destacan, acetato de etilo, eliminando agua con sulfato de sodio anhidro (Quintero *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2005; Hajslová *et al.*, 1998), acetonitrilo (Sojo *et al.*, 1997) acetona con reparto en diclorometano-éter de petróleo (Dogheim *et al.*, 1999). Este tipo de extracción proporciona excelentes resultados. Sin embargo, es un proceso largo y tedioso que presenta una serie de inconvenientes entre los que se puede mencionar el empleo de grandes cantidades de disolventes (cuyo costo es muy elevado), formación de emulsiones, exposición del analista a grandes volúmenes de solventes tóxicos y peligrosos y finalmente, la disposición de desechos del análisis.

La extracción con solventes orgánicos asistida por ultrasonido puede eliminar algunos de estos inconvenientes ya que se requiere pequeñas cantidades de muestras y de solventes, lo que se traduce en la minimización de los desechos que se generan en el análisis (Tang *et al.*, 2005). Adicionalmente, la extracción empleando ultrasonido acelera la transferencia de masas de los componentes por medio de la absorción de ondas sonoras por el disolvente y la muestra, produciendo un aumento en la temperatura del sistema y por consiguiente la difusión de los compuestos desde la matriz al disolvente (Albelda *et al.*, 1994; Sánchez *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2005). Todo ello conlleva a mejorar la eficiencia de extracción y a disminuir el tiempo de análisis.

Antes del análisis cromatográfico,

acetate, by eliminating water with anhydrous sodium sulphate (Quintero *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2005; Hajslová *et al.*, 1998), acetonitrile (Sojo *et al.*, 1997) acetone con reparto in oil dichloromethane-ether (Dogheim *et al.*, 1999). This type of extraction offer excellent results, however, is a long and boring process that shows a serial of inconvenient like the use of high quantities of solvents (with a very high cost), emulsions formation, exposition of the analyst to a high toxic and dangerous solvents volumes and finally, the analysis wastes disposition.

The extraction with organic solvents ultra sound assisted can eliminate some of these problems since little quantities of samples and solvents, which is translate in minimization of wastes generated in the analysis (Tang *et al.*, 2005). Additionally, the extraction by using ultra sound accelerates mass transfer of component through the absorption of sound waves by solvent and sample, producing an increase on system temperature and consequently the diffusion of compounds from matrix to solvent (Albelda *et al.*, 1994; Sánchez *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2005). All this takes to improve the extraction efficiency and to diminish the time of analysis.

Before the chromatographic analysis, the complex matrix such as soils, biological materials and natural products requires cleanup. The solvents extracts can be cleaned with traditional chromatographic columns or with extraction cartridges in solid phase (SPE). For cleanup of vegetal extracts solid phases like Florisil, silica, alumina, C₈ and C₁₈, activated

las matrices complejas tales como suelos, materiales biológicos y productos naturales requieren algún grado de limpieza (cleanup). Los extractos de solventes pueden ser limpiados con columnas cromatográficas tradicionales o con cartuchos de extracción en fase sólida (SPE). Para la limpieza de extractos vegetales se ha empleado fases sólidas como florisil, sílice, alúmina, C₈ y C₁₈, carbón activado y grafitado (Ettiene *et al.*, 2008; Ettiene *et al.*, 2006; Ettiene *et al.* 2005; Remesh *et al.*, 1999; Podhorniak *et al.*, 2001; Schenck *et al.*, 2000).

Cada rubro agrícola constituye una matriz diferente, por lo que para cada tipo de matriz pueden requerirse modificaciones de los métodos de extracción y limpieza, lo que conlleva a la búsqueda continua de nuevos conocimientos sobre las ventajas e inconvenientes de los métodos de extracción, limpieza. La complejidad de las matrices de hojas y tallos de guayabo, hace laboriosa la determinación de los OPs empleando métodos tradicionales (Ettiene, 2006); de allí la importancia innovativa de este trabajo de investigación.

El objetivo de este trabajo fue validar un método de extracción con solventes orgánicos asistida con ultrasonido y limpieza de los extractos en fase sólida para determinar los insecticidas organofosforados clorpyrifos y malation en muestras de hojas y tallos de tres tipos de guayabo (*Psidium guajava* L.): Criolla Roja, Brasileira y Tamare.

Material y métodos

La investigación se desarrolló en

and graphited carbon have been used (Ettiene *et al.*, 2008; Ettiene *et al.*, 2006; Ettiene *et al.* 2005; Remesh *et al.*, 1999; Podhorniak *et al.*, 2001; Schenck *et al.*, 2000).

Each crop constitutes a different matrix, thereby, for each matrix type modifications of extraction and cleanup methods can be required, that takes to the continuous looking for new knowledge about advantages and disadvantages of extraction and cleanup methods. The complexity of leaves and stems of guava matrix makes difficult the OPs determination by using traditional methods (Ettiene, 2006); that is why, this research becomes relevant.

The purpose of this research was to validate an extraction method with organic solvents ultra sound assisted and extracts cleanup in solid phase to determine those organophosphorus insecticides chlorpyrifos and malathion in samples of leaves and stems of three types of guava (*Psidium guajava* L.): "Criolla Roja", "Brasileira" and "Tamare".

Materials and methods

Research was carried out in the Chromatography Section of the Agronomical Researches Institute, Agronomy Faculty, University of Zulia.

Standards of chlorpyrifos (o.o-diethyl-o-3.5.6-trichloride-2-piridil phosphorothioate) and malathion (o.o-dimethyl-S-1.2-carboetoxyethyl dithiophosphate) high purity (99.0% and 98.5%) insecticides, Dr. Ehrenstorfer GMBH (Germany) were used to prepare mother solutions (2000,0 µg.mL⁻¹) of each insecticide.

la Sección de Cromatografía del Instituto de Investigaciones Agronómicas de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia.

Se emplearon estándares de los insecticidas clorpirifos (o,o-dietil-o-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato) y malatión (o,o-dimetil-S-1,2-carboetoxietil ditiofosfato) de alta pureza (99,0% y 98,5%), Dr. Ehrenstorfer GMBH (Alemania) para preparar soluciones madre (2000,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de cada insecticida. Trifenilfosfato (TPP) con 99,0% de pureza (Riedel de Haën), se usó como estándar interno. Los solventes empleados para el desarrollo de este trabajo fueron: acetona (99,8% de pureza, Riedel de Haën), acetato de etilo y n-hexano (98,5% de pureza, E.M. Science), diclorometano y acetonitrilo (99,9% de pureza Fisher Scientific Company). Se prepararon soluciones de trabajo por dilución con acetato de etilo y metanol y se almacenaron en la oscuridad a 4,0°C.

La cuantificación se realizó empleando un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Autosystem equipado con una columna capilar DB-17 de 30m x 0,53 mm D.I. x 1,0 μm de espesor de película de 50% fenil metil polisiloxano, un detector selectivo nitrógeno-fósforo y un inyector automático Perkin Elmer. El tiempo total de la corrida fue 30 min.

Las muestras de tallos y hojas de guayabo se obtuvieron del Umbráculo de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia. Se tomaron aleatoriamente 3 ramas de cada tipo de plantas de guayabo (Criolla Roja, Brasilera, Tamare) y se homogeneizaron en un procesador de alimentos (Oster).

Triphenyl phosphate (TPP) 99.0% purity (Riedel de Haën), was used like internal standard. Solvents used for the development of this research were: acetone (99.8% purity, Riedel de Haën), ethyl acetate and n-hexane (98.5% purity, E.M. Science), dichloromethane and acetonitrile (99.9% purity Fisher Scientific Company). Work solutions by dilution with ethyl acetate and methanol and they were stored in darkness to 4.0°C.

The quantification was carried out using a gases chromatograph Perkin Elmer Autosystem equipped with a capillary column DB-17 of 30m x 0.53mm D.I. x 1.0 μm width of film 50% phenyl methyl polisiloxane, a selective detector nitrogen-phosphorous and an automatic injector Perkin Elmer. The total time of run was 30 min.

The stems and leaves samples of guava were obtained at the greenhouse of the Agronomy Faculty, Universidad del Zulia. Three branches of each type of guava ("Criolla Roja", "Brasilera", "Tamare") plants were at random taken and they were after homogenized in a food processor (Oster).

Optimization of extraction assisted with ultrasound without cleaning

For the optimization of extraction assisted with ultra sound without cleaning of extracts, 2.0 g of a representative portion of samples were taken and standard additions of Chlorpyriphos and Malathion were done to different concentration levels (0.025-3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), different solvents were added to the sample (10.0 mL), consequently, they were immersed on an ultrasound bath (ultra sound type

Optimización de la extracción asistida con ultrasonido sin limpieza

Para la optimización de la extracción asistida con ultrasonido sin limpieza de los extractos, se tomaron 2,0 g de una porción representativa de muestras y se realizaron adiciones estándar de clorpyrifos y malation a diferentes niveles de concentración (0,025-3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), se adicionó a la muestra diferentes solventes (10,0 mL), seguidamente, se introdujeron en un baño ultrasónico (ultrasonido tipo LC-130 H Elma, con frecuencia de 35 KHz) para la extracción, a diferentes tiempos (2-10 min). Los extractos se concentraron y se inyectaron (1,0 μL) por duplicado en el cromatógrafo de gases.

Optimización de la extracción asistida con ultrasonido y limpieza en fase sólida

Los extractos de hojas y tallos de guayabo obtenidos de la extracción con solventes asistida con ultrasonido resultaron muy coloreados, debido a los pigmentos que se coextraen en el proceso de extracción, por lo que fue necesario realizar la limpieza de los extractos. Para ello, se evaluaron diferentes fases sólidas en fase normal previamente acondicionados (cuadro 1), como: aminopropil (empaque SPE, Alltech, 500 mg/4,0 mL), florisil (J.T.Baker) activada (600°C por 4 horas), gel de sílice (red 230-400 ASTM, seg. Stahl, tipo 60 para cromatografía de capa fina) activada (130°C por 24 horas) y las fases carbonáceas: carbón activado (Fisher Scientific Company) y carbón grafitado (Alltech Associates, Inc.).

Se prepararon columnas cromatográficas (8,0 mL), para empaque las diferentes fases de adsorción:

LC-130 H Elma, with 35 KHz frequency) for the extraction, to different times (2-10 min). The extracts were concentrate and injected (1.0 μL) by duplicate in the gas chromatograph.

Optimization of the assisted extraction with ultrasound and cleaning in solid phase

The extracts of guava leaves and stems obtained from extraction with solvents ultrasound assisted were very colored, because pigments co-extracted during extraction process that is why it was necessary to do the extracts cleanup. Different solid phases were tested in normal phase previously conditioned (table 1), like: aminopropyl (empaque SPE, Alltech, 500 mg/4,0 mL⁻¹), florisil (J.T.Baker) activated (600°C during 4 hours), silica gel (red 230-400 ASTM, seg. Stahl, type 60 for thin layer chromatography) activated (130°C by 24 hours) and the carbonaceous phases: activated carbon (Fisher Scientific Company) and graphitized Carbon Black (Alltech Associates, Inc.).

Chromatographic columns were prepared (8.0 mL) to pack the different adsorption phases: silica and florisil (1000 mg), activated carbon (200 mg) and graphitized Carbon Black (200 and 250 mg).

The clean collected extract was concentrated by evaporation with nitrogen, until 2.0 mL, to be injected (1.0 μL) by duplicate on the gases chromatograph.

As a function of recovery percentages obtained the extraction solvent, optimum extraction time and the more efficient solid phase for cleaning of extracts selected.

Cuadro 1. Acondicionamiento de fases sólidas en la etapa de limpieza.**Table 1. Solid phases conditioning in cleaning stage.**

Fase sólida	Solvente	Volumen (mL)	Flujo (mL.min ⁻¹)
Aminopropil	n-hexano	5,0	2,0
Sílice	n-hexano	5,0	2,0
Florisil	n-hexano	5,0	2,0
Carbón activado	acetato de etilo/acetona (90:10)	5,0	2,0
	Metanol		
Carbón grafitado	acetato de etilo/acetona (90:10)	5,0	2,0
	Metanol		

sílice y florisil (1000 mg), carbón activado (200mg) y carbón grafitado (200 y 250mg).

El extracto limpio recolectado se concentró por evaporación con nitrógeno, hasta 2,0 mL, para ser inyectado (1,0 µL) por duplicado en el cromatógrafo de gases.

En función de los porcentajes de recuperación obtenidos se seleccionó el solvente de extracción, el tiempo de extracción óptimo y la fase sólida más eficiente para la limpieza de los extractos.

En cada fase de la investigación se aplicó análisis estadístico: estadística descriptiva, cálculo de promedios, desviación estándar, desviación estándar relativa, prueba de medias por Tukey y análisis de correlación. Los datos obtenidos se procesaron mediante el programa estadístico SAS (Statistical System, Versión 8.0), SAS, Institute, (1999)

Resultados y discusión

Análisis Cromatográfico y límites de detección

An statistical analysis was applied each research: descriptive statistic, average estimations, standard deviation, relative standard deviation, Tukey mean test and correlation analysis. Data obtained were processed through the statistical program SAS (Statistical System, Version 8.0), SAS, Institute, (1999)

Results and discussion

Chromatographic analysis and detection limits

Insecticides quantification was accomplished by gases chromatography by using conditions optimized by Ettiene *et al.*, (1997). The retaining times obtained for chlorpyrifos and malathion were 14.75 min and 15.10 min, respectively. Both insecticides showed good calibration curves with high lineal correlation coefficient (0.9993 and 0.9999). Detection limits for method, estimated using the Miller and Miller criterion (Miller-Miller, 1993), were 0.0147µg.g⁻¹ for chlorpyrifos and 0.0213µg.g⁻¹ for malathion, results that

La cuantificación de los insecticidas se realizó por cromatografía de gases empleando las condiciones optimizadas por Ettiene *et al.*, (1997). Los tiempos de retención obtenidos para clorpyrifos y malatión fueron 14,75 min y 15,10 min, respectivamente. Ambos insecticidas presentaron buena linealidad en las curvas de calibración con altos coeficientes de correlación lineal (0,9993 y 0,9999). Los límites de detección para el método, calculados utilizando el criterio de Miller y Miller (Miller-Miller, 1993), fueron 0,0147 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para clorpyrifos y 0,0213 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para malatión, resultados estos que muestran una adecuada sensibilidad del método de análisis a bajas concentraciones. Sánchez *et al.*, (2005), obtuvieron un límite de detección mayor para clorpyrifos (0,0205 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y menor para malatión (0,0165 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en muestras de frutos de guayabo, empleando extracción con solventes sin limpieza. Ettiene *et al.*, (2008), obtuvieron un menor límite de detección para malatión en muestras de cebollín y cilantro (0,0016 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) empleando extracción con solventes orgánicos y limpieza en fase sólida.

Optimización de la extracción asistida con ultrasonido sin limpieza

Para la optimización de la extracción asistida con ultrasonido, se evaluó la eficiencia de la recuperación de los insecticidas en las matrices estudiadas, utilizando solventes orgánicos puros (acetato de etilo, hexano, diclorometano, n-hexano y acetonitrilo) y mezclas de estos (acetato de etilo:acetona (80:20), acetato de etilo:acetona (90:10) acetato de etilo:acetonitrilo (80:20), acetato de

shown an adequate sensitiveness of analysis method to low concentrations. Sánchez *et al.*, (2005), obtained a detection limit superior for chlorpyrifos (0.0205 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and inferior for malathion (0.0165 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) in guava fruit samples, by using solvents extraction without cleaning. Ettiene *et al.*, (2008), obtained a low detection limit for malathion in onion and coriander samples (0.0016 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) using extraction with organic solvents solid phase cleaning.

Optimizing of extraction assisted with ultrasound without cleaning

To optimizing the extraction assisted with ultrasound, the insecticides recovery efficiency was evaluated on the matrix studied, using pure organic solvents (ethyl acetate, hexane, dichloromethane, n-hexane and acetonitrile) and also mixing of them (ethyl acetate:acetone (80:20), ethyl acetate:acetone (90:10) ethyl acetate:acetonitrile (80:20), ethyl acetate, n-hexane:acetone (90:10); volume is constant (10.0 mL) and the extraction time in ultrasound (2.0 min).

In leaves samples the higher recovery was obtained with ethyl acetate (39.3% and 35.3%), for chlorpyrifos and malathion, respectively. The lower recovery was obtained with dichloromethane (24.0% and 21.0%). In stems samples the behavior was similar, being obtained the maximum recovery with ethyl acetate (52.7 and 49.0%) and the lower one with dichloromethane (28.5% and 23.5%). Yi *et al.*, (2006), obtained a higher recovery of malathion (69%), with dichloromethane in ginger roots

etilo, n-hexano:acetona (90:10); manteniendo constante el volumen (10,0 mL) y el tiempo de extracción en el ultrasonido (2,0 min).

En muestras de hojas la mayor recuperación se obtuvo con acetato de etilo (39,3% y 35,3%), para clorpirifos y malatión, respectivamente. La menor recuperación se obtuvo con diclorometano (24,0% y 21,0%). En muestras de tallos el comportamiento fue similar, obteniéndose la máxima recuperación con acetato de etilo (52,7 y 49,0%) y la menor con diclorometano (28,5% y 23,5%). Yi *et al.*, (2006), obtuvieron una mayor recuperación de malatión (69%), con diclorometano en raíces de jengibre empleando extracción acelerada con solventes.

Los resultados obtenidos utilizando los diferentes solventes orgánicos, indican que malatión se retiene en mayor proporción en las matrices de este tipo de muestras, esto posiblemente se deba a que posee una polaridad relativamente más alta que clorpirifos mostrando así un carácter hidrofílico que permite la mayor penetración de éste en las matrices vegetales. Además, las extracciones con acetonitrilo (solvente con una polaridad relativamente alta), produjeron extractos con mayor coloración verde y aspecto turbio, lo que indica una mayor extracción de pigmentos y arrastre de materia suspendida comparados con los de menor polaridad como es el caso del n-hexano, diclorometano y acetato de etilo. En términos generales, las recuperaciones para los distintos solventes en las muestras de tallos y hojas de guayabo fueron bajas (<55,0%), lo que requirió la evaluación de la eficiencia de la recuperación con mezclas de solventes.

by using accelerate extraction with solvents.

The results obtained using the different organic solvents shown that malathion is retained in a higher proportion in matrix of this type of samples, possibly this is caused by the relatively higher polarity than chlorpyrifos, showing an hydrophilic character that permit the higher penetration of this on vegetal matrix. Besides, the extractions with acetonitrile (solvent with a relatively high polarity), produced extracts with higher green coloration and misty aspect, that indicates a higher pigment extraction and dragging of suspended material compared with those of lower polarity like n-hexane, dichloromethane and ethyl acetate. The recoveries for the different solvents in stems and leaves samples of guava were lower (<55.0%) which required the evaluation of recovery efficiency with solvent mixing.

With mixing of organic solvents, recoveries increased, being obtained values higher than 50.0% for both insecticides, with a recovery maximum for the ethyl acetate/acetone mixing (90:10) of 75.3% for chlorpyrifos and the minimum recovery was for the ethyl acetate/acetonitrile mixing (80:20) of 51.8% for malathion. In stems samples, the higher recovery was obtained with ethyl acetate/acetonitrile (80:20) with 89.6% of recovery for chlorpyrifos, and the lower recovery was obtained with ethyl acetate/acetone mixing (80:20) with 57.2% for malathion.

Sánchez *et al.*, (2005), obtained an acceptable accuracy and recovery efficiency (mayor al 80.0%) for both

Con las mezclas de solventes orgánicos las recuperaciones aumentaron, obteniéndose valores mayores al 50,0% para los dos insecticidas, con un máximo de recuperación para la mezcla acetato de etilo/acetona (90:10) de 75,3% para clorpirifos y la mínima recuperación para la mezcla acetato de etilo/acetonitrilo (80:20) de 51,8% para el insecticida malatión. En muestras de tallos, la mayor recuperación fue obtenida con acetato de etilo/acetonitrilo (80:20) con 89,6% de recuperación para clorpirifos, y la menor recuperación con la mezcla acetato de etilo/acetona (80:20) con 57,2% para malatión.

Sánchez *et al.*, (2005), obtuvieron una aceptable precisión y eficiencia de recuperación (mayor al 80,0%) para estos dos insecticidas en muestras de frutos de guayabo, utilizando la mezcla acetato de etilo/acetona (90:10), empleando agitación magnética. Sin embargo, es importante destacar que los sistemas de mezclas de solventes conformados por solventes con diferente polaridad, como acetato de etilo y acetonitrilo, seguían produciendo extractos con intensa coloración a diferencia de la mezcla n-hexano/acetona (90:10) cuyo extracto presentó menor intensidad de color. Además, la etapa de evaporación del extracto con nitrógeno ocurrió mas rápidamente para esta mezcla.

Para seleccionar el sistema de solventes más eficiente se aplicaron los criterios sugeridos por Kuet *et al.*, (2004): baja toxicidad, bajo costo, volatilidad adecuada para la rápida evaporación sin causar pérdidas de los insecticidas, polaridad apropiada y que produzca un extracto final libre de

insecticidas in guava fruit samples, using the ethyl acetate/acetone mixing (90:10), using magnetic agitation. However, it is important to detach that solvents mixing systems formed with different polarity like ethyl acetate and acetonitrile, continue producing extracts with intense coloration, in contrast to the n-hexane/acetone mixing (90:10) with an extract that showed lower color intensity. Besides, the stage of extract evaporation with nitrogen was faster for this mixing.

To select the more efficient solvent system those criteria suggested by Kuet *et al.*, (2004) were applied: low toxicity, low cost, adequate volatility for the rapid evaporation without causing losses on insecticides, appropriate polarity and production of a final extract free from co-extractive interferences. The n-hexane/acetone mixing (90:10) fulfilled with most of these characteristics, but recovery percentages with this mixing under conditions described, continue being low. Based on these results and with the purpose of increasing the recovery efficiency of insecticides in extraction, the effect of extraction time on ultrasound was evaluated by using the n-hexane/acetone mixing (90:10).

The figure 1 shows the recovery percentages of chlorpyrifos and malathion insecticides in guava leaves. From 4 min of extraction the recoveries begins to be higher than 75.0% for both insecticides, getting the maximum recovery to 6 min of extraction, 93.1% for chlorpyrifos and 83.8% for malathion.

Figure 2 shows the recovery percentages obtained for both insecticides in the guava stems

interferencias coextractivas. La mezcla n-hexano/acetona (90:10) cumplió con la mayoría de estas características, pero los porcentajes de recuperación con esta mezcla bajo las condiciones descritas anteriormente, seguían siendo bajos. Con base en estos resultados y con la finalidad de aumentar la eficiencia de recuperación de los insecticidas en la extracción, se evaluó el efecto del tiempo de extracción en el ultrasonido con la mezcla n-hexano/acetona (90:10).

La figura 1 muestra los porcentajes de recuperación de los insecticidas clorpirifos y malation en hojas de guayabo. Puede observarse que a partir de 4 minutos de extracción las recuperaciones comienzan a ser mayores al 75,0% para los dos insecticidas, logrando la máxima recuperación a los 6min de extracción, 93,1% para clorpirifos y 83,8% para malatión.

En la figura 2 se presentan los porcentajes de recuperación obtenidos para los insecticidas en la muestra de tallos de guayabo, observándose un comportamiento similar al obtenido en hojas, solo que los valores a un tiempo de 4 min son mayores al 80,0% para los dos insecticidas y la máxima recuperación se obtuvo a los 8 minutos de extracción 105,4% para clorpirifos y 92,8% para malatión.

A partir de 6 minutos se logró obtener altas recuperaciones (83,8-101,7%) para los dos insecticidas en ambas matrices, indicando así una aceptable recuperación de clorpirifos y malatión en muestras de tallos y hojas de guayabo con la mezcla n-hexano/acetona (90:10) y 6min de extracción asistida con ultrasonido, manteniendo el volumen de solvente en

sample, being observed a similar behavior to those obtained in leaves, only those values at a time of 4min are higher than 80.0% for both insecticides and the maximum recovery was obtained to 8 min of extraction 105.4% for chlorpyrifos and 92.8% for malathion.

High recoveries were obtained from 6 min (83.8-101.7%) for both insecticides in matrix, showing an acceptable recovery of chlorpyrifos and malathion in stems and leaves samples of guava with the n-hexane/acetone mixing (90:10) and 6 min of extraction assisted with ultrasound, keeping the solvent volume in 10.0 mL and the sample quantity in 2.0 g. Similar results were obtained by Tang *et al.* (2005), in medicinal herb, getting high recoveries percentages (> 90%) in determination of organophosphorus insecticides by using extraction assisted with ultrasound.

Optimizing of the extraction assisted with ultrasound and solid phase cleaning

In the stage of extracts clearing, two important analytical compromises have to be accomplished; the first one, it is to reduce and/or eliminate the interferences in extracts (pigments, fats, sugars, among others) and the second one, to recover the analyte of the cleaning phase.

Leaves and guava stems because the presence of chlorophyll pigments produce intense green extracts. These co-extracted pigments blocked the injection system of gases chromatograph, thereby it was necessary to remove the glass wool and to accomplish periodical cleanings of the injection system. This phenomenon

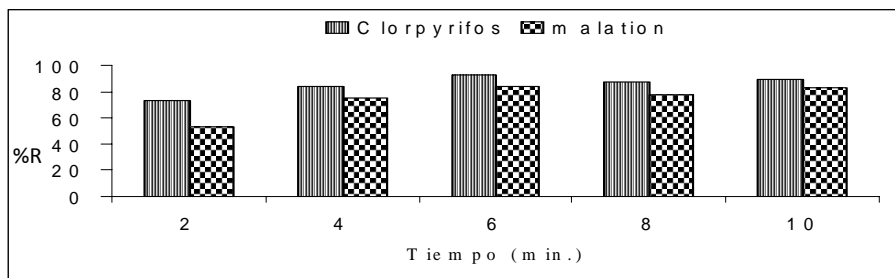


Figura 1. Estudio de recuperación de los insecticidas clorpirifos y malatión a diferentes tiempos de extracción en el ultrasonido en muestras de hojas de guayabo (Criolla Roja).

Figure 1. Recovery study of chlorpyrifos and malathion insecticides to different extraction times on ultrasound in guava (Criolla Roja) leaves samples.

10,0mL y la cantidad de muestra en 2,0 g. Resultados similares obtuvieron Tang *et al.*, (2005), en hierbas medicinales, logrando altos porcentajes de recuperación (>90%) en la determinación de insecticidas organofosforados empleando extracción asistida con ultrasonido.

Optimización de la extrac-

also was observed by Lehotay *et al.*, (2005), who evaluated insecticides residues in leaves vegetables.

With the purpose of eliminating the pigmentation of extracts was necessary to evaluate cleaning after the extraction assisted with ultrasound in different solid phases. Table 3 shows the effectiveness of different solid

Figura 2. Estudio de recuperación de los insecticidas clorpirifos y malatión a diferentes tiempos de extracción en el ultrasonido en muestra de tallos de guayabo (Criolla Roja).

Figure 2. Recovery study of chlorpyrifos and malathion insecticides to different extraction times on ultrasound in guava (Criolla Roja) stems samples.

ción asistida con ultrasonido y limpieza en fase sólida.

En la etapa de limpieza de los extractos se debe cumplir con dos compromisos analíticos muy importantes; el primero, es reducir y/o eliminar las interferencias en los extractos (pigmentos, grasas, azúcares, entre otros) y el segundo, recuperar el analito de la fase de limpieza.

Las hojas y tallos de guayabo debido a la presencia de pigmentos clorofilicos producen extractos de color verde intenso. Estos pigmentos coextraídos obstruyeron el sistema de inyección del cromatógrafo de gases, por lo que fue necesario remover la lana de vidrio y realizar limpiezas periódicas del sistema de inyección. Este fenómeno también fue observado por Lehotay *et al.*, (2005), quienes evaluaron residuos de insecticidas en vegetales de hojas.

Con la finalidad de eliminar la pigmentación de los extractos fue necesario evaluar la limpieza luego de la extracción asistida con ultrasonido con diferentes fases sólidas. En el cuadro 3, se muestra la efectividad de diferentes fases sólidas para la limpieza de los extractos de hojas de guayabo. Se puede observar que cuando se utilizó la mezcla acetato de etilo/acetona (90:10) como solvente de elución se obtuvo recuperaciones mayores al 80,0% para los dos insecticidas con los adsorbentes sílice (clorpyrifos 102,1% y malatión 103,8%), con florisil (clorpyrifos 101,4% y malatión 86,9%) y con 250 mg de carbón grafitado (clorpyrifos 102,9% y malatión 100,1%). Para la fase sólida aminopropil se obtuvo valores de 73,5% y 75,5% para clorpyrifos y malatión,

phases for cleaning extracts of guava leaves. It can be observed that the ethyl acetate/acetone missing (90:10) was used like elution solvent, recoveries higher than 80.0% were obtained for both insecticides with the adsorbents silica (chlorpyrifos 102.1% and malathion 103.8%), with Florisil (Chlorpyrifos 101.4% and malathion 86.9%) and with 250 mg of graphited carbon (chlorpyrifos 102.9% and malathion 100.1%). For solid phase aminopropyl was obtained of 73.5% and 75.5% for chlorpyrifos and malathion, respectively. When activated carbon was used, a low recovery was obtained for chlorpyrifos (28.8%) and high for malathion (84.6%).

For the insecticides elution of solid phases, volume of solvents was used according to the removal degree of pigments each solid phase; silica, florisil and aminopropyl only need 4 mL of solvent to obtain and extract without cloudy but with a high pigments concentration (intense green color extract), in contrast of graphitized Carbon Black (250.0 mg) and activated carbon 10.0 mL of solvent were required and pigments removal was total (colorless).

Table 2 also shows recovery values of insecticides chlorpyrifos and malathion in leaves using the different adsorption phases for cleaning extract and like elution solvent, the n-hexane/acetone mixing (90:10). It is observed that recovery values of insecticide malathion were lower with all the solid phases except with 200.0 mg of graphitized Carbon Black (86.9%). In case of chlorpyrifos the recovery percentages were higher

respectivamente. Cuando se empleó carbón activado se obtuvo una baja recuperación para clorpirifos (28,8%) y alta para malation (84,6%).

Para la elución de los insecticidas de las fases sólidas se utilizó volúmenes de solventes de acuerdo al grado de remoción de pigmentos de cada fase sólida; sílice, florisil y aminopropil necesitaron solo 4mL del solvente para obtener un extracto sin turbidez pero con gran concentración de pigmentos (extracto de color verde intenso), en cambio con carbón grafitado (250,0 mg) y carbón activado se requirió 10,0 mL del solvente y la remoción de los pigmentos fue total (incoloreo).

El cuadro 2 también muestra los valores de recuperación de los insecticidas clorpirifos y malation en hojas utilizando las diferentes fases de adsorción para la limpieza del extracto y como solvente de elución la mezcla n-hexano/acetona (90:10). Se observa que los valores de recuperación del insecticida malation fueron bajos con todas las fases sólidas excepto con 200,0 mg de carbón grafitado (86,9%). En el caso de clorpirifos los porcentajes de recuperación resultaron mayores al 60,0% con todas las fases sólidas de limpieza, obteniéndose mayor recuperación del insecticida con 200,0 mg de carbón grafitado (99,5%). Cabe destacar, que la recuperación de clorpirifos aumentó con carbón activado y con el solvente de elución de menor polaridad, estos valores evidencian la mayor afinidad de clorpirifos por solventes de baja polaridad. El volumen de elución se disminuyó para las fases sólidas sílice, florisil y aminopropil a 2,0 mL obteniéndose con estas una remoción parcial de los pigmentos, presentando

than 60.0% with all the solid phases of cleaning, being obtained a higher recovery of insecticide with 200.0 mg of graphitized Carbon Black (99.5%). It is possible to detach that chlorpyrifos recovery increased with activated carbon and with elution solvent of low polarity, these values shows the high affinity of chlorpyrifos by low polarity solvents. The elution volume decreased for solid phases silica, florisil and aminopropyl to 2.0 mL being obtained with these a partial removal of pigments, showing the eluate a yellow color and also, the recoveries decreased for both insecticides. For the graphited (200.0 mg) and activated carbon phases, a volume of 8.0 mL which remove all the extract pigments.

The recovery percentages of insecticides chlorpyrifos and malathion in stems by using the different adsorption phases for cleaning of extract and like elution solvents, the ethyl acetate/acetone mixing (90:10) and n-hexane/acetone (90:10) are shown in table 3. By using the solvent ethyl acetate/acetone (90:10), it is observed a similar behavior to those obtained in leaves with recoveries higher than 80.0% for the adsorbents silica (chlorpyrifos 101.3% and malathion 100.5%), florisil (chlorpyrifos 95.7% and malathion 95.8%), graphited carbon 250.0mg (chlorpyrifos 93.5% and malathion 95.8%), aminopropyl (84.3% for chlorpyrifos and 60.5% for malathion). A low recovery for chlorpyrifos (36.7%) and a high one for malathion (93.3%) were obtained with graphited carbon. When elution was done with n-hexane/acetone

Cuadro 2. Efectividad de la limpieza de los extractos utilizando diferentes fases sólidas para la determinación de los insecticidas clorpirifos y malatión en muestras de hojas de guayabo (Criolla Roja).

Table 2. Extracts cleaning effectiveness using different solid phases for determination of chlorpyrifos and malathion insecticides in guava (Criolla Roja) leaves samples.

Fase sólida	Condición	Solvente de elución	Flujo (mL.min ⁻¹)	Volumen (mL)	Insecticida	%R
Sílice (1000,0 mg)	1	Acetato de etilo/acetona (90:10)	0,5	4,0	Clorpirifos	102,1
	2	n-hexano/acetona (90:10)	0,5	2,0	Malatión	103,8
Florisil (1000,0 mg)	3	Acetato de etilo/acetona (90:10)	0,5	4,0	Clorpirifos	60,5
	4	n-hexano/acetona (90:10)	0,5	2,0	Malatión	25,3
Aminopropil (500,0 mg)	5	Acetato de etilo/acetona (90:10)	0,5	4,0	Clorpirifos	101,4
	6	n-hexano/acetona (90:10)	0,5	2,0	Malatión	87,00
Carbón activado (200,0 mg)	7	Acetato de etilo/acetona (90:10)	0,5	10,0	Clorpirifos	76,24
	8	n-hexano/acetona (90:10)	0,5	8,0	Malatión	0,0
Carbón grafitado (250,0 mg)	9	Acetato de etilo/acetona (90:10)	0,5	10,0	Clorpirifos	73,5
	10	n-hexano/acetona (90:10)	0,5	8,0	Malatión	75,5
Carbón grafitado (200,0 mg)	11	Acetato de etilo/acetona (90:10)	0,33	5,0	Clorpirifos	101,3
					Malatión	35,8
					Clorpirifos	28,8
					Malatión	84,6
					Clorpirifos	61,3
					Malatión	65,6
					Clorpirifos	102,9
					Malatión	100,1
					Clorpirifos	99,5
					Malatión	86,9
					Clorpirifos	101,5
					Malatión	99,9

el eluato un color amarillo y además de esto, las recuperaciones disminuyeron para los dos insecticidas. Para las fases carbón grafitado (200,0 mg) y activado se utilizó un volumen de 8,0 mL, con el cual se logró remover todos los pigmentos del extracto.

El cuadro 3 muestra los porcentajes de recuperación de los insecticidas clorpirifos y malation en tallos utilizando las diferentes fases de adsorción para la limpieza del extracto y como solventes de elución las mezclas acetato de etilo/acetona (90:10) y n-hexano/acetona (90:10). Utilizando el solvente acetato de etilo/acetona (90:10), se observa un comportamiento similar al obtenido en hojas con recuperaciones mayores al 80,0% para los adsorbentes sílice (clorpirifos 101,3% y malatión 100,5%), florisil (clorpirifos 95,7% y malatión 95,8%), carbón grafitado 250,0 mg (clorpirifos 93,5% y malatión 95,8%), aminopropil (84,3% para clorpirifos y 60,5% para malatión). Con carbón activado se obtuvo baja recuperación para clorpirifos (36,7%) y alta para malatión (93,3%). Cuando se realizó la elución con la mezcla n-hexano/acetona (90:10), se obtuvo valores de recuperación muy bajos para malation con las diferentes fases. Sin embargo, con 200,0 mg de carbón grafitado se alcanzó 81,7%, y 92,8% para clorpirifos.

Estos resultados pueden deberse a que el carbón activado se caracteriza por ser predominantemente hidrofóbico en toda su estructura y posee una forma irregular con elevada porosidad que le confiere alta área superficial (Matisová *et al.*, 1996); está característica del carbón activado podría explicar la retención total de los pigmentos y las

mixing (90:10), very low recovery values were obtained for malathion with different phases. However, with 200.0 mg of graphitized Carbon Black the 81.7% was reached and 92.8% for chlorpyrifos.

These results can be caused by the hydrophobic character of the activated carbon in all its structure and it have an irregular shape with high porosity that gives a high superficial area (Matisová *et al.*, 1996); this characteristic could possibly explain the total retaining of pigments and the low recoveries of chlorpyrifos, because its affinity with solid phase of irregular carbon; on the contrary, the graphitized Carbon Black have a regular structure of combined aromatic rings which have the property to absorb polar molecules with a high water solubility that permit to be useful for pigments removal and the obtaining of high recoveries of little polar insecticides (Di Corcia *et al.*, 1993; Lehotay *et al.*, 2005). Also, the carbon adsorbents have several advantages over other phases commonly used like thermic stability, chemical resistance and stability on wide pH intervals (Matisová *et al.*, 1996).

An additional essay permitted to evaluate the clearing efficiency with graphitized Carbon Black (200.0 mg) using as an elution solvent the ethyl acetate/acetone mixing (90:10). The recovery percentages with these conditions increased, 104.4% for chlorpyrifos and 98.3% for malathion on the stems samples. In leaves samples 101.5% was obtained for chlorpyrifos and 99.9% for malathion, using a volume of elution

Cuadro 3. Efectividad de la limpieza de los extractos utilizando diferentes fases sólidas para la determinación de los insecticidas clorpirifos y malatión en muestras de tallos de guayabo (Criolla Roja).

Table 3. Extracts cleaning effectiveness using different solid phases for determination of chlorpyrifos and malathion insecticides in guava (Criolla Roja) stems samples.

Fase sólida	Condición	Solvente de elución	Flujo (mL.min ⁻¹)	Volumen (mL)	Insecticida	%R
Sílice (1000 mg)	1	Acetato de etilo/acetona (90:10)	0,5	4,0	Clorpirifos	101,3
	2	n-hexano/acetona (90:10)	0,5	2,0	Malatión	100,5
Florisisil (1000,0 mg)	3	Acetato de etilo/acetona (90:10)	0,5	4,0	Clorpirifos	66,9
	4	n-hexano/acetona (90:10)	0,5	2,0	Malatión	42,2
Aminopropil (500,0mg)	5	Acetato de etilo/acetona (90:10)	0,5	4,0	Clorpirifos	95,7
	6	n-hexano/acetona (90:10)	0,5	2,0	Malatión	88,9
Carbón activado (200,0mg)	7	Acetato de etilo/acetona (90:10)	0,5	10,0	Clorpirifos	66,9
	8	n-hexano/acetona (90:10)	0,5	8,0	Malatión	0,0
Carbón grafitado (250,0 mg)	9	Acetato de etilo/acetona (90:10)	0,5	10,0	Clorpirifos	83,3
	10	n-hexano/acetona (90:10)	0,5	8,0	Malatión	60,5
Carbón grafitado (200,0 mg)	11	Acetato de etilo/acetona (90:10)	0,33	5,0	Clorpirifos	100,2
					Malatión	55,5

bajas recuperaciones del insecticida clorpirifos, debido a su afinidad con la fase sólida de carbón irregular; en cambio, el carbón grafitado posee una estructura regular de anillos aromáticos fusionados la cual tiene la propiedad de adsorber moléculas polares con alta solubilidad en agua, lo que le permite ser útil para la remoción de pigmentos y la obtención de altas recuperaciones de los insecticidas poco polares (Di Corcia *et al.*, 1993; Lehotay *et al.*, 2005). Además los adsorbentes de carbón tienen ciertas ventajas sobre otras fases comúnmente utilizadas, como son: estabilidad térmica, resistencia química y estabilidad sobre amplios intervalos de pH (Matisová *et al.*, 1996).

Un ensayo adicional permitió evaluar la eficiencia de la limpieza con carbón grafitado (200,0 mg) usando como solvente de elución la mezcla acetato de etilo/acetona (90:10). Los porcentajes de recuperación con estas condiciones aumentaron, 104,4% para clorpirifos y 98,3% para malatión en las muestras de tallos. En muestras de hojas se obtuvo 101,5% para clorpirifos y 99,9% para malatión, utilizando un volumen de solvente de elución de 5,0 mL a un flujo de 0,33 mL.min⁻¹. Cabe destacar que previo a esta prueba se evaluó la eficiencia de la limpieza con estas condiciones pero a un flujo de 0,5 mL.min⁻¹, observándose un color amarillo en el eluato recolectado lo que condujo a la disminución del flujo a 0,33 mL.min⁻¹, obteniéndose así una efectiva limpieza y óptimas recuperaciones.

Con base en los resultados obtenidos, se aplicó la metodología validada (condición 11) para evaluar la eficiencia de la extracción de malatión y

solvent of 5.0 mL to a flux of 0.33 mL.min⁻¹. It is possible to detach that before this test the cleanup efficiency was evaluated with these conditions but to a flux of 0.5 mL.min⁻¹, being observed a yellow color in the eluate collected which caused the flux decrease to 0.33 mL.min⁻¹, obtaining an effective cleaning and optimum recoveries.

Based on this results obtained, the validated methodology (condition 11) to evaluate the extraction efficiency of malathion and chlorpyrifos in leaves and stems of guava ("Criolla Roja", "Tamare" and "Brasileira"), to different concentration levels (0.025, 0.05 and 0.25 µg.g⁻¹). As extraction solvent, the n-hexane/acetone mixing (90:10) was used with extraction time on ultrasound of 6.0 min. The extracts were cleanup up with 200.0 mg of graphited carbon, making the elution with 5 mL of ethyl acetate/acetone (90:10) (tables 3 and 4). Tables 5 and 6 shows the statistical analysis for recoveries obtained from insecticides in the three guava types at different concentration levels.

It can be observed that high recovery percentages for both insecticides in both samples. In leaves, 101.5% chlorpyrifos and 99.9% malathion; in stems, 104.4% chlorpyrifos and 98.3% malathion was obtained. Low relative standard deviations were obtained, which shows a high accuracy of the analysis method in relation to repeatability (RSD<2%) and reproducibility (RSD<5%).

The statistical analysis (Tukey mean test), showed significant differences (P≤0.05) for recovery mean values of different concentration values on leaves and stems samples between the guava types "Criolla Roja"-

clorpirifos en muestras de hojas y tallos de guayabo de tres tipos (Criolla Roja, Tamare y Brasileira), a diferentes niveles de concentración (0,025, 0,05 y 0,25 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Como solvente de extracción se empleó la mezcla n-hexano/acetona (90:10) con un tiempo de extracción en el ultrasonido de 6,0min. Los extractos se limpiaron con 200,0 mg de carbón grafitado, realizando la elución con 5 mL de acetato de etilo/acetona (90:10). (cuadros 2 y 3). En los cuadros 4 y 5 se muestran los análisis estadísticos para las recuperaciones obtenidas de los insecticidas en los tres tipos de guayabo a los diferentes niveles de concentración.

Puede observarse que se obtuvieron altos porcentajes de recuperación para los dos insecticidas en los dos tipos de muestras. En hojas 101,5% clorpirifos y 99,9% malatión. En tallos 104,4% clorpirifos y 98,3% malatión. Se obtuvo bajas desviaciones estándar relativas, lo que indica una alta precisión del método de análisis en términos de repetibilidad (RSD<2%) y reproducibilidad (RSD<5%).

El análisis estadístico (pruebas de medias por Tukey), arrojó que existen diferencias significativas ($P\leq 0,05$) para los valores medios de recuperación de los diferentes niveles de concentración en muestras de hojas y tallos entre los tipos Criolla Roja-Brasileira y Criolla Roja-Tamare. Esto podría atribuirse al hecho de que los tres tipos de plantas de guayabo presentan diferencias fisiológicas y morfológicas que afectan la extracción de los insecticidas. (Sánchez *et al.*, 2005). El método validado se aplicó para estudiar la persistencia del insecticida clorpirifos en hojas y tallos de tres

"Brasileira" and "Criolla Roja"- "Tamare". This is probably due to the three guava types shown physiological and morphological differences that affect the insecticides extraction. (Sánchez *et al.*, 2005). Method validated was applied to study persistence of chlorpyrifos on leaves and stems of guava plants ("Criolla Roja", "Brasileira", "Tamare") (García, 2006).

Conclusions

The combination of the extraction assisted with ultrasound and solid phase cleanup with graphitized Carbon Black, for the OPs extraction in stems and leaves samples of the three types of guava ("Criolla Roja", "Tamare" and "Brasileira") was an effective because it permitted to obtain high recoveries with a high accuracy to different concentration levels of the insecticides chlorpyrifos and malathion.

Acknowledgement

Authors want to express their thanks to the Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) by the financing gave to the project CC-0107-06.

End of english version

tipos de plantas de guayabo (Criolla Roja, Brasileira, Tamare) (García., 2006).

Conclusiones

La combinación de la extracción

Cuadro 4. Estudio de recuperación de los insecticidas clorpirifos y malatión a diferentes niveles de concentración en muestras de hojas de tres tipos de guayabo utilizando la mezcla n-hexano/acetona (90:10) para la extracción y para la limpieza la condición 11 señalada en el cuadro 3.

Table 4. Recovery study of chlorpyrifos and malathion insecticides at different concentration levels on leaves samples of three guava types using the n-hexane/acetone (90:10) mix for extraction and for cleaning of condition 11 (table 3).

Tipo de guayabo	Insecticida	Nivel de concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Porcentaje de recuperación promedio (%)	Desviación estándar relativa (%)
Brasilera ^x	Clorpirifos	0,025	94,2	5,0
	Malatión	0,025	99,5	0,8
	Clorpirifos	0,05	96,9	3,1
	Malatión	0,05	100,9	1,0
	Clorpirifos	0,25	98,9	0,4
	Malatión	0,25	100,5	0,5
Criolla Roja ^y	Clorpirifos	0,025	90,5	5,7
	Malatión	0,025	88,7	5,7
	Clorpirifos	0,05	95,9	1,3
	Malatión	0,05	89,1	6,7
	Clorpirifos	0,25	93,0	0,9
	Malatión	0,25	88,3	3,2
Tamare ^x	Clorpirifos	0,025	99,7	0,1
	Malatión	0,025	94,8	1,6
	Clorpirifos	0,05	99,6	0,2
	Malatión	0,05	95,9	3,4
	Clorpirifos	0,25	97,7	0,6
	Malatión	0,25	98,6	1,1

x y y: las medias muestrales de los tipos de guayaba con letras distintas difieren significativamente ($P \leq 0,05$)

asistida con ultrasonido y limpieza en fase sólida con carbón grafitado, para la extracción de OPs en muestras de tallos y hojas de los tres tipos de guayabo (Criolla Roja, Tamare y Brasilera) fue efectiva ya que permitió obtener altas recuperaciones con una alta precisión a diferentes niveles de concentración de los insecticidas clorpirifos y malatión

Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento al CONDES por el financiamiento del proyecto CC-0107-06.

Literatura citada

Albelda, C., Y. Pico. 1994. Determination of

Cuadro 5. Estudio de recuperación de los insecticidas clorpirifos y malatión a diferentes niveles de concentración en muestras de tallos de tres tipos de guayabo utilizando la mezcla n-hexano/acetona (90:10) para la extracción y para la limpieza la condición 11 señalada en el cuadro 4.

Table 5. Recovery study of chlorpyrifos and malathion insecticides at different concentration levels on stems samples of three guava types using the n-hexane/acetone (90:10) mix for the extraction and for cleaning condition 11 (table 4).

Tipo de guayabo	Insecticida	Nivel de concentración (µg.g ⁻¹)	Porcentaje de recuperación promedio (%)	Desviación estándar relativa (%)
Brasilera ^x	Clorpirifos	0,025	105,5	2,1
	Malatión	0,025	101,1	1,2
	Clorpirifos	0,05	102,9	3,4
	Malatión	0,05	101,6	0,3
	Clorpirifos	0,25	101,1	0,7
	Malatión	0,25	101,2	1,5
Criolla Roja ^y	Clorpirifos	0,025	101,6	0,6
	Malatión	0,025	99,2	0,4
	Clorpirifos	0,05	101,3	2,1
	Malatión	0,05	98,0	0,6
	Clorpirifos	0,25	99,2	0,5
	Malatión	0,25	94,7	3,7
Tamare ^z	Clorpirifos	0,025	100,2	0,6
	Malatión	0,025	102,1	0,1
	Clorpirifos	0,05	100,2	0,2
	Malatión	0,05	99,3	1,1
	Clorpirifos	0,25	102,3	1,2
	Malatión	0,25	100,6	1,0

x , y y z: las medias muestrales de los tipos de guayaba con letras distintas difieren significativamente (P<0,05)

aldicarb, aldicarb sulfoxide, and aldicarb sulfone in oranges by simple gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus detection. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 77:74-78.

Chirinos, D., F. Geraud. 1999. Desarrollo poblacional de la mota blanca, *Capulinia* sp. (Hemiptera: Eriococcidae) sobre tres especies de *Psidium* bajo condiciones de

laboratorio. Rev. Fac. Agron. (LUZ). Suplemento 1: 23-29.

Di Corcia, A., R. Samperi., A. Marcomini., S. Stelluto. 1993. Graphitized carbón black extraction cartridges for monitoring polar pesticides in water. Anal. Chem. 65:907-912.

Dogheim, S. M., S.A. Gad Alla., A. M. El-Marsafy. 1999. Monitoring pesticide

- residues in Egyptian fruits and vegetables in 1995. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 82:948-955.
- Ettiene, G., S. Ortega., D. Medina., J. Sepúlveda., L. Sandoval. 2008. Optimización y Validación de un método de extracción y limpieza en fase sólida para la determinación de insecticidas organofosforados en cebollín (*Allium fistulosum* L.) y cilantro (*Coriandrum sativum* L). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 25:550-569.
- Ettiene, G., S. Ortega., D. Medina., J. Sepúlveda., I. Buscema and L. Sandoval. 2006. Dissipation of Organophosphorus Pesticides in Green Onion (*Allium fistulosum* L), Cultivated in Forced System "Barbacoas". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76:415-421.
- Ettiene, G. 2006. Comparación de Métodos Analíticos para la extracción y limpieza (cleanup) de residuos de insecticidas organofosforados en matrices agrícolas. Trabajo de Ascenso para optar a la Categoría de profesor Asociado. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. 106p.
- Ettiene, G., S. Ortega., J. Sepúlveda., D. Medina., I. Buscema and L. Sandoval. 2005. Persistence of Diazinon, Malathion and Parathion in Coriander (*Coriandrum sativum* L), Cultivated in Barbacoas. *Tropical Agriculture*. 82 N° 4: 343-348.
- Ettiene, G., A. Prieto., D. Medina., I. Buscema. 1997. Residuos de insecticidas organofosforados en mosto y vino de uvas. *Rev. Tec. Ing. Univ. Zulia*. 20:223-230.
- García, P. 2006. Extracción ultrasónica y limpieza (cleanup) en fase sólida para la determinación de insecticidas organofosforados en hojas y tallos de guayabo (*Psidium guajava* L.). Trabajo Especial de Grado para optar al título de Licenciado en Química. Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias. División de Estudios Básicos Sectoriales, Maracaibo, Venezuela. 60p.
- Hajslová, J., K. Holadova., V. Kocourek., J. Poustka., M. Godula., P. Cuhra. 1998. Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. *J. Chromatogr. A*. 800:283-295.
- Kuet, A., L. Seng. 2004. Solid-phase extraction cleanup method for the determination of organophosphorus pesticides in vegetables. *Malaysian Journal of Chemistry* .6:29-38.
- Lehotay, S., A. De Kok., M. Hiemstra and P. Bodegraven. 2005. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometry detection. *J AOAC Int*, Vol 88(2):595-614.
- Lozoya, X., M. Meckes., M. Abou-Zaid., J. Tortoriello., C. Nozzolillo and J.T. Amason. 1994. Quercetina glycosides in *Psidium guajava* L. Leaves and determination of a spasmolytic principle. *Arch. Med. Res.* 25:11-15.
- Matisová, E., L. Kaksliková., J. Lesko. 1996. Application of porous charcoal for solid-phase extraction of dicarboximide fungicide residues from wines in combination with high-resolution capillary gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr A*. 445:445-454.
- Miean, K.H. and S. Mohamed. 2001. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, luteolin and Apigenin) content of edible tropical plants. *J. Agric. Food. Chem.* 49:3106-3112.
- Miller, J. C.; Miller, J. M. 1993. Estadística para Química Analítica. Segunda Edición; Addison-Wesley Iberoamericana. México. 286 p.
- Picó, J., y Y. Font. 2003. Revisión de los métodos de determinación de residuos de plaguicidas en alimentos. *Rev Toxicol.* 20:166-175.
- Podhorniak, V., J. Negron., F. Griffith. 2001. Gas chromatography with pulsed flame photometric detection multiresidue method for organophosphate pesticide and metabolite residues at the parts-per-billion level in representative

- commodities of fruit and vegetable crop groups. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 84:873-890.
- Quintero, A., M. Caselles., G. Ettiene., N.G. de Colmenares., T. Ramírez y D. Medina. 2008. Monitoring of organophosphorus pesticides residues in vegetables of agricultural area in Venezuela. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 81:393-396
- Remesh, A., M. Balasubramanian. 1999. The impact of household preparations on the residues of pesticides in selected agricultural food commodities available in India. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 82:725-737.
- Rodriguez, F., M. Torrez. 1999. Disminución del tránsito intestinal en ratones por tintura de guayaba (*Psidium guajava L.*). Rev. Cubana Plant. Med. 3(2):54-56.
- Ross, H. 1999. Medicinal Plants of the World. Ed. Humana Press. Totowa, NJ, pp:263-281.
- Statistical Analysis System (SAS) Institute, Inc. 1999. SAS User's Guide: Statistics. SAS Institute, Inc., Cary, NC.
- Sanchez, C., B. Albero. 2002. Determination of insecticides in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection and mass spectrometric confirmation. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 85:128-133.
- Sánchez, J., G. Ettiene., I. Buscema., D. Medina. 2005. Persistencia de los Insecticidas Organofosforados Malatión y Clorpirifos en Guayaba (*Psidium guajava*). Rev. Fac. Agron. (LUZ). 22:65-75.
- Schenck, F., S. Lehotay. 2000. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food. J. Chromatogr A. 868:51-61.
- Sojo, L. E., A. Broke., J. Fillion., S.M. Price. 1997. Application of activated carbon membranes for on-line cleanup of vegetable and fruit extracts in the determination of pesticide multiresidues by gas chromatography with mass selective detection. J. Chromatogr. A. 788:141-154.
- Tang, F., Y. Yue. 2005. Development of methods for determination of the residues of 15 pesticides in medicinal herbs *Isatis indigotica Fort.* by capillary gas chromatography with electron capture or flame photometric detection. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 88:720-728.
- Vargas-Alvarez, D., M. Soto., V. González., E. Engleman y A. Martínez. 2006. Cinética de acumulación y distribución de flavonoides en guayaba (*Psidium guajava L.*). Agrociencia. 40:109-115.
- Yi, X., Q. Hua and Y. Lu. 2006. Determination of organophosphorus pesticide residues in the root of *Platycodon grandiflorum* by solid-phase extraction and gas chromatography with flame photometric detection. J. AOAC. 89(1):225-231.