

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Validación de un método para la determinación de residuos de plaguicidas en brócoli,
Brassica oleracea, por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas
(GC-MSD)

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias Químicas
con mención en Química Analítica

JIMENA ALEGRÍA SALVADOR RODRÍGUEZ

Quito, 2012

CERTIFICADO

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas, con mención en Química Analítica, de la candidata Jimena Alegría Salvador Rodríguez ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Fecha: 26 de abril de 2012

Director de la Disertación

DEDICATORIA

A ti, por tu apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

A todos quienes hicieron posible este trabajo, muchas gracias por su apoyo.

Al Centro de Estudios y Asesoría en Salud, por haberme dado todas las facilidades para llevar a cabo este trabajo y sobre todo al ingeniero Orlando Felicita, por su apoyo, paciencia y enseñanzas.

A todos los profesores que conforman la Escuela de Ciencias Químicas, por haberme transmitido tantos conocimientos que van más allá del aspecto académico y sobre todo al ingeniero Marcelo Parreño C. por su guía y ayuda en la dirección de esta tesis.

TABLA DE CONTENIDOS

Certificado	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos.....	iv
Tabla de contenidos.....	v
Lista de tablas	vii
Lista de figuras	x
Lista de anexos	xi
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
CAPÍTULO 1: PARTE TEÓRICA	8
1.1. EL BRÓCOLI.....	8
1.1.1. CULTIVOS EN EL PAÍS	9
1.1.2. LAS ENFERMEDADES Y PLAGAS DEL BRÓCOLI	9
1.2. CONTROL DE PLAGAS	10
1.2.1. PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS	13
1.2.2. PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS	15
1.2.3. PIRETRINAS Y PIRETROIDES	18
1.3. REQUISITOS DE CALIDAD DEL BRÓCOLI.....	20
1.3.1. LÍMITES MÁXIMOS RESIDUALES	20
1.3.2. CONTROL Y MONITOREO DE PLAGUICIDAS EN EL ECUADOR	22
1.4. ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS.....	23
1.4.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	23
1.4.2. DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	24
1.5. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	27
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.1. INSTRUMENTACIÓN, REACTIVOS Y ESTÁNDARES	30
2.1.1. INSTRUMENTACIÓN	30
2.1.2. REACTIVOS	31
2.1.3. ESTÁNDARES.....	31

2.2. MÉTODOS.....	32
2.2.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.....	33
2.2.1. DESARROLLO Y ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO.....	34
2.2.2.1. Desarrollo y optimización del método cromatográfico en modo SCAN... 34	
2.2.2.2. Desarrollo del método cromatográfico en modo de monitoreo selectivo de iones	36
2.2.2.3. Cuantificación de los analitos	36
2.2.2.4. Tratamiento de la muestra.....	37
2.2.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	38
2.2.4. APLICACIÓN DEL MÉTODO	40
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
3.1. DESARROLLO Y ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO	41
3.1.1. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO EN MODO SCAN	41
3.1.2. DESARROLLO DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO EN MODO DE MONITOREO SELECTIVO DE IONES.....	45
3.1.3. CUANTIFICACIÓN.....	48
3.1.3.1. Intervalo de trabajo en la muestra.....	48
3.1.3.2. Curva de calibración	48
3.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO	51
3.2.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ESTÁNDAR	51
3.2.1.1. Solución Stock	51
3.2.1.2. Solución madre	52
3.2.1.3. Soluciones de trabajo	53
3.2.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO	55
3.2.3. VALIDACIÓN DE LA ETAPA DE TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	66
3.2.4. RESUMEN DE VALIDACIÓN	70
3.3. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN MUESTRAS DE BRÓCOLI	72
3.3.1. TOMA DE MUESTRAS	72
3.3.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	74
3.3.3. RESULTADOS.....	75
3.3.4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....	79

CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	80
BIBLIOGRAFÍA	82
ANEXOS	86
Declaración y autorización	151

LISTA DE TABLAS

<u>Tabla 1.1.</u> Propiedades del endosulfán I, endosulfán II y endosulfán sulfato.....	14
<u>Tabla 1.2.</u> Propiedades del clorpirifós, diazinón, dimetoato y malatión.....	17
<u>Tabla 1.3.</u> Propiedades de la alfa-cipermetrina.....	19
<u>Tabla 1.4.</u> Límites Máximos Residuales para brócoli.....	21
<u>Tabla 1.5.</u> Parámetros de validación de un método analítico.....	28
<u>Tabla 2.1.</u> Condiciones iniciales de operación del GC-MS.....	35
<u>Tabla 3.1.</u> Componente identificado y porcentaje de similitud.....	42
<u>Tabla 3.2.</u> Condiciones de operación óptimas para el análisis de siete plaguicidas por GC-MS.....	43
<u>Tabla 3.3.</u> Tiempos de retención de los 8 analitos bajo condiciones óptimas de operación.....	43
<u>Tabla 3.4.</u> Parámetros del método BROCOLISIMDEFINITIVO.....	46
<u>Tabla 3.5.</u> Concentraciones de las soluciones stock empleadas en la validación.....	52
<u>Tabla 3.6.</u> Concentración de cada plaguicida en la solución madre empleada en la validación.....	53
<u>Tabla 3.7.</u> Concentraciones de las soluciones de trabajo empleadas en la validación.....	54
<u>Tabla 3.8.</u> Error porcentual e incertidumbre en la preparación de soluciones de trabajo....	54
<u>Tabla 3.9.</u> Resultados de la validación del método cromatográfico.....	56
<u>Tabla 3.10.</u> Datos de la curva de calibración del dimetoato obtenidos en la validación	58
<u>Tabla 3.11.</u> Concentraciones estimadas de los valores experimentales.....	60
<u>Tabla 3.12.</u> Repetibilidad y precisión intermedia.....	61
<u>Tabla 3.13.</u> Incertidumbre por variabilidad.....	62
<u>Tabla 3.14.</u> Incertidumbres combinadas de cada nivel de concentración.....	63

<u>Tabla 3.15.</u> Datos de la curva de calibración del dimetoato para la determinación de LD y LC.....	64
<u>Tabla 3.16.</u> Límites de detección y cuantificación.....	65
<u>Tabla 3.17.</u> Resultados de la validación de la etapa de tratamiento de la muestra.....	67
<u>Tabla 3.18.</u> Datos de la curva de calibración del dimetoato obtenida para las muestras fortificadas	67
<u>Tabla 3.19.</u> Concentraciones estimadas y porcentajes de recuperación obtenidos para el dimetoato.....	69
<u>Tabla 3.20.</u> Porcentajes de recuperación y desviaciones estándar relativas para cada nivel de fortificación.....	69
<u>Tabla 3.21.</u> Código correspondiente a cada mercado.....	73
<u>Tabla 3.22.</u> Cronograma para preparación de muestras y análisis de extractos.....	75
<u>Tabla 3.23.</u> Resultados experimentales del análisis de las muestras de brócoli.....	78

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura 1.1.</u> Estructura básica de un plaguicida organofosforado.....	15
<u>Figura 1.2.</u> Esquema de un cromatógrafo de gases acoplado a un detector por espectrometría de masas.....	25
<u>Figura 3.1.</u> Cromatograma obtenido de la primera inyección.....	42
<u>Figura 3.2.</u> Separación de los ocho analitos con el método SIM.....	47
<u>Figura 3.3.</u> Curva de calibración del dimetoato generada por el software.....	50
<u>Figura 3.4.</u> Curva de calibración ajustada del dimetoato obtenida en la validación	58
<u>Figura 3.5.</u> Curva de calibración del dimetoato para la determinación de LD y LC.....	64
<u>Figura 3.6.</u> Curva de calibración para las muestras fortificadas.....	68
<u>Figura 3.7.</u> Reporte de cuantificación.....	76
<u>Figura 3.8.</u> Cromatograma correspondiente al reporte.....	76

LISTA DE ANEXOS

<u>Anexo 1:</u> Norma NTE INEN 1976:2003.....	87
<u>Anexo 2:</u> Certificados de análisis de los estándares de plaguicidas.....	96
<u>Anexo 3:</u> Procedimientos para la preparación de las soluciones estándar.....	103
<u>Anexo 4:</u> Procedimiento de preparación de muestra propuesto por el fabricante.....	110
<u>Anexo 5:</u> Diagrama de flujo de la preparación de la muestra.....	112
<u>Anexo 6:</u> Fórmulas para los cálculos necesarios en la validación.....	114
<u>Anexo 7:</u> Espectros de masas de los ocho analitos de interés.....	120
<u>Anexo 8:</u> Curvas de calibración de los ocho analitos de interés.....	127
<u>Anexo 9:</u> Resúmenes de validación de diazinón, malatión, clorpirifós, endosulfán I, endosulfán II, endosulfán sulfato y alfa-cipermetrina.....	132
<u>Anexo 10:</u> Protocolo de validación.....	141

RESUMEN

En este trabajo se desarrolló y validó un método para la determinación de residuos de siete plaguicidas en brócoli. Los plaguicidas estudiados fueron alfa-cipermetrina, clorpirifós, diazinón, dimetoato, endosulfán I, endosulfán II y malatión. Adicionalmente se analizó el endosulfán sulfato, producto de degradación del endosulfán.

El tratamiento de la muestra se realizó empleando el método QuEChERS, que consiste en tres etapas principales: 1) homogenización de la muestra; 2) extracción con solvente, en presencia de sales que favorecen la extracción; y 3) limpieza del extracto, mediante extracción en fase sólida dispersiva.

La técnica analítica empleada fue la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas. Para la identificación de los analitos se compararon los espectros de masas obtenidos con espectros de referencia de una base de datos. Para la cuantificación se prepararon curvas de calibración en matriz con materiales de referencia certificados, a 6 niveles de concentración, cubriendo un rango de 0,02 ng/μl a 2,00 ng/μl, con las cuales se pueden cuantificar muestras con concentraciones de 0,02 mg/kg a 2,00 mg/kg.

El método fue validado según el modelo sugerido por el Instituto Ecuatoriano de Normalización y conforme a los requisitos técnicos de la norma NTE-ISO/IEC 17025. Los resultados demostraron que el método es confiable y adecuado para su propósito.

Para probar la validez del método desarrollado y validado, se realizó un estudio de los niveles de concentración de los 8 analitos en brócoli en 8 mercados del Distrito

Metropolitano de Quito. Se analizaron 32 muestras, pero no se encontraron residuos de plaguicida en ninguna de las muestras, lo cual indica que la población de Quito no está expuesta a brócoli contaminado por estos plaguicidas.

Palabras clave: Plaguicidas, brócoli, GC-MS, QuEChERS, validación.

ABSTRACT

A method for the determination of pesticide residues in broccoli was developed and validated. The pesticides subject to study were alfa-cypermethrin, chlorpyrifos, diazinon, dimethoate, endosulfan I, endosulfan II and malathion. Additionally, the endosulfan degradation product, endosulfan sulfate, was also analyzed.

The QuEChERS method was used for the sample preparation. This method entails 3 main steps: 1) sample homogenization; 2) solvent extraction in presence of salts which enhance the extraction and 3) extract clean-up using dispersive solid-phase extraction. The analysis was performed through gas chromatography with mass spectrometry detection.

The identification of the analytes was done comparing mass spectra to reference spectra obtained from a database. For quantification, certified reference materials at six concentration levels were used to prepare matrix-matched calibration curves, covering a range from 0,02 ng/μl to 2,00 ng/μl, which allow to quantify samples with concentrations from 0,02 mg/kg to 2,00 mg/kg.

The method was validated according to the model suggested by the Ecuadorian Institute of Standarization and in conformity with the technical requirements of the standard NTE-ISO/IEC 17025. The validation data showed that the method is reliable and fit for its purpose.

A study on pesticide concentration levels in broccoli was performed in eight markets of the Metropolitan District of Quito. 32 samples were analyzed but no pesticide residues were

found in any of the samples, indicating that the inhabitants of Quito are not exposed to contaminated broccoli.

Key words: Pesticides, broccoli, GC-MS, QuEChERS, validation

INTRODUCCIÓN

El consumo de frutas y vegetales ha aumentado considerablemente debido a que la población está más consciente de sus beneficios para la salud como fuentes importantes de vitaminas y fibra. Sin embargo, hoy en día la mayoría de cultivos son tratados con plaguicidas, ya que estos benefician al productor al aumentar el rendimiento del cultivo, conservar la calidad del producto y extender su durabilidad.

Puesto que los plaguicidas son aplicados directamente en el cultivo, algunos de ellos pueden estar presentes como residuos en los vegetales y frutas después de su cosecha y, si son empleados de manera inapropiada o muy frecuente, pueden constituir un riesgo para los consumidores. Por esta razón, algunas entidades gubernamentales y organizaciones internacionales han establecido límites máximos residuales para evitar excesos en la cantidad de plaguicidas en los alimentos.

En el mundo, sobre todo en los países más desarrollados, se han aumentado los controles de residuos de plaguicidas, tanto a los alimentos importados como a los producidos internamente. Sin embargo, esta no es la situación en el Ecuador: los productos de consumo interno son poco controlados. Esto, sumado al uso inadecuado de plaguicidas y la falta de buenas prácticas agropecuarias, revela que es necesario comenzar a desarrollar e implementar métodos de análisis de residuos de plaguicidas en frutas y vegetales para su monitoreo y establecer el riesgo al que están expuestos los consumidores ecuatorianos.

En este trabajo el producto elegido fue el brócoli. Éste es principalmente de exportación, pero también es vendido a nivel interno. Adicionalmente, su consumo ha ido aumentando debido a sus beneficios para la salud y a su creciente demanda en países como los Estados Unidos, en los cuales el consumo de brócoli ha aumentado en 300% en los últimos 30 años.

En el año 1997 la División de Toxicología Ambiental de la Comisión Ecuatoriana de Energía Atómica realizó un estudio para determinar residuos de clorpirifós en brócoli para exportación. La técnica analítica empleada fue la cromatografía de gases con detector FPD en modo P. El tratamiento de la muestra consistió en la extracción del analito en acetato de etilo y la limpieza en columnas Extralut 20, logrando porcentajes de recuperación de 97%. El análisis de las muestras indicó que no había residuos de clorpirifós [1].

El análisis de plaguicidas en frutas y vegetales, debido a la complejidad de los analitos, consume mucho tiempo y es de alto costo debido a la calidad y cantidad de los solventes que se utilizan. Sin embargo, se ha desarrollado un método rápido, barato, con poco uso de solventes y excelentes resultados de recuperación, conocido como QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*, que significa rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro), que se usa para la etapa de tratamiento de la muestra previa al análisis por cromatografía de gases o cromatografía líquida de alta eficiencia con detección por espectrometría de masas. Este es el método que se eligió en este estudio, empleando la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas como técnica analítica.

Debido a que todo método analítico debe garantizar la confiabilidad de sus resultados, se validó el método desarrollado, con lo cual se evaluó su aplicabilidad y eficiencia.

En este estudio, los objetivos son:

- 1 Desarrollar un método analítico para la determinación de residuos de siete plaguicidas en brócoli por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- 2 Determinar la eficiencia del método de extracción utilizado, mediante fortificaciones con soluciones de concentraciones conocidas realizadas en brócoli producido orgánicamente.
- 3 Demostrar que el método analítico proporciona resultados fiables y adecuados para su propósito, mediante su validación siguiendo los requisitos técnicos establecidos en la norma ISO 17025.
- 4 Determinar si hay presencia de residuos de plaguicidas en el brócoli comercializado en varios mercados del Distrito Metropolitano de Quito y cuantificarlos.
- 5 Establecer si los residuos de plaguicidas detectados están dentro de los límites máximos permisibles de residuos establecidos por el Codex Alimentarius, la Unión Europea y los Estados Unidos.

En este trabajo, se presentará en un primer capítulo una breve descripción del brócoli. Se explicará en qué consiste el control de plagas y cuáles son los requisitos de calidad del brócoli, cómo se realiza el análisis de plaguicidas y finalmente, qué es la validación de un método analítico. En el segundo capítulo se describirán los materiales y métodos empleados en este estudio que consiste en tres partes: el desarrollo y estandarización del método, su validación y el análisis de las muestras tomadas de los mercados seleccionados. El tercer capítulo reportará los resultados obtenidos en cada parte de este estudio. Finalmente, en el cuarto capítulo se presentarán las conclusiones y recomendaciones de este estudio.

CAPÍTULO 1: PARTE TEÓRICA

1.1. EL BRÓCOLI

El brócoli (*Brassica oleracea*), originario de Asia Occidental y Europa, es una hortaliza de la familia *Cruciferae* o *Brassicacea*, muy cercana a la coliflor. Se caracteriza por tener hojas grandes, algo rizadas, de color verde oscuro, más divididas y pecioladas que las de la coliflor, y un grueso nervio central [2]. Las hojas rodean a la cabeza o pella que consiste en yemas florales, de color verde, morado o grisáceo, con botones diferenciables [3]. Esta cabeza constituye la parte comestible de la planta.

El brócoli es una hortaliza muy nutritiva. Es rico en proteínas, vitaminas y carotenos, especialmente betacarotenos de alto poder antioxidante, y posee un alto contenido de fibra [4]. Su consumo también es beneficioso debido a que contiene sulforofano, una sustancia que, según estudios realizados en el Centro Integral del Cáncer de la Universidad de Michigan, podría ayudar a prevenir y tratar el cáncer de mama, puesto que ataca y mata a las células madres del cáncer e impide que crezcan nuevos tumores [5].

El brócoli contiene: 71% de carbohidratos, 9% de grasas y 20% de proteínas. Una porción de 100 g de brócoli crudo, aproximadamente una taza de brócoli picado, tiene un aporte de 34 kilocalorías, 7 g de carbohidratos totales, 3 g de fibra dietética y 3 g de proteína y no tiene colesterol. Además aporta con el 12% del Valor Diario Recomendado (VDR) en vitamina A, 149% en vitamina C y 116% en vitamina K, y es fuente de calcio, hierro, manganeso, zinc, fósforo, potasio, entre otros [6].

Por otra parte, también tiene valor comercial y económico. Actualmente, el brócoli producido en Ecuador es destinado principalmente a la exportación. Se estima que se exporta un 98% de la producción nacional de brócoli [7]. Es así como en el 2008 Ecuador ocupó el sexto lugar como país exportador de brócoli a nivel mundial, junto con España, Francia, Estados Unidos, Italia y México [8]. Durante el 2010, se exportaron 34041 toneladas de brócoli, cuyos principales destinos fueron Estados Unidos (32%), Japón (25%) y Alemania (18%) [9].

1.1.1. CULTIVOS EN EL PAÍS

Según el tercer Censo Nacional Agropecuario realizado en el 2000, existían 3359 hectáreas sembradas de brócoli, con un rendimiento promedio de 14,6 toneladas por hectárea. El 99% del brócoli se produce en la Sierra, siendo las provincias de Cotopaxi (68%), Pichincha (16%) e Imbabura (10%) las de mayor cultivo [10]. En la actualidad, se estima que la superficie sembrada asciende a alrededor de 6000 hectáreas, con un rendimiento de 18 toneladas por hectárea [11].

1.1.2. LAS ENFERMEDADES Y PLAGAS DEL BRÓCOLI

Como toda hortaliza, el brócoli está expuesto a una serie de plagas y enfermedades que deben ser tratadas para evitar una disminución significativa en la producción. A pesar de que la producción de brócoli se da en altura (2700-3200 msnm) y esto limita la presencia de plagas, existen variedades resistentes que afectan al brócoli [7].

Los insectos de suelo y de follaje constituyen las principales plagas que atacan al brócoli. Entre los primeros se encuentran los trozadores como el *Agrotis ipsilon*. Los que atacan al follaje son el pulgón (*Aphis gossypii*) y la polilla de las crucíferas o minador (*Plutella xylostella*) [12].

Entre las enfermedades más comunes están el mal de almácigos (causado por varios hongos como *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Fusarium*, *Phytophthora* y *Pythium*), el mildew veloso (*Peronospora parasítica*), la *Alternaria sp.* y la hernia de las crucíferas (*Plasmodiophora brassicae*) [12, 13].

1.2. CONTROL DE PLAGAS

Para el control de plagas, se emplean sustancias químicas conocidas como plaguicidas. Según la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos, un plaguicida es “cualquier sustancia o mezcla de sustancia cuyo propósito es prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga”. Una plaga puede constituirse de insectos, ratones u otros animales, plantas indeseadas, hongos o microorganismos como bacterias y virus. El término plaguicida no se refiere solamente a insecticidas, sino también a herbicidas, fungicidas o cualquier otra sustancia empleada para controlar plagas [14].

Los plaguicidas pueden ser clasificados siguiendo varios criterios, por ejemplo:

- el organismo que interesa controlar,
- la naturaleza química, y
- el modo de acción.

En la primera clasificación, se distinguen:

- insecticidas (controlan insectos, sean larvas, hormigas, pulgas, piojos, pulgones, etc.),
- acaricidas (ácaros o garrapatas),
- nematocidas (nemátodos),
- molusquicidas (moluscos),
- rodenticidas (ratas),
- avicidas (palomas),
- bactericidas (bacterias),
- fungicidas (hongos), y
- herbicidas (hierbas) [15].

La segunda clasificación distingue, según la naturaleza química, plaguicidas:

- orgánicos, entre los cuales están organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretrinas y piretroides, entre otros;
- inorgánicos: sulfato de cobre, sulfato ferroso, cobre y azufre, entre otros.

En la tercera clasificación se dividen los plaguicidas por su modo de acción:

- plaguicidas de contacto: son aquellos en el que el control de la plaga se da por contacto directo, es decir, que la plaga muere cuando se le rocía directamente el plaguicida o cuando entra en contacto con superficies previamente rociadas;
- plaguicidas sistémicos: éstos son absorbidos por plantas o animales y se mueven hacia áreas o tejidos no tratados. En el caso de las plantas, los plaguicidas se mueven por translocación hacia hojas, tallos o raíces no tratadas.

Para prevenir y combatir las plagas y enfermedades que afectan al brócoli, se usan diversos plaguicidas, entre los cuales están organoclorados, organofosforados, piretroides y carbamatos. Para las plagas del brócoli se recomienda usar clorpirifós, dimetoato, diazinón, endosulfán, carbaril, metamidofós, imidacloprid, cipermetrina, entre otros [13]. En cambio, para las enfermedades del brócoli, se suele emplear oxiclورو de cobre, maneb, mancoceb, propineb, entre otros.

En este estudio se realizó el análisis de residuos de siete insecticidas: dos organoclorados (endosulfán alfa y endosulfán beta), cuatro organofosforados (clorpirifós, diazinón, dimetoato y malatión) y un piretroide (alfa-cipermetrina). Adicionalmente, se analizó endosulfán sulfato, producto de degradación del endosulfán.

Estos plaguicidas fueron seleccionados siguiendo tres criterios:

- los plaguicidas recomendados por Agripac, una empresa comercializadora de insumos para la agroindustria en Ecuador,
- los plaguicidas empleados en una finca productora de brócoli, según la lista proporcionada por su propietario, y
- los estándares de plaguicidas de que dispone el Laboratorio de Investigación y Asesoría en Plaguicidas del Centro de Estudios y Asesoría en Salud en el cual se realizó este trabajo.

A continuación se presentan las características y propiedades de los plaguicidas seleccionados y sus efectos en la salud.

1.2.1. PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS

Son aquellas sustancias que tienen en su estructura al menos un átomo de cloro y que tienen acción plaguicida. Este grupo de plaguicidas incluye derivados clorados del etano (DDT), el primer insecticida usado, ciclodienos (clordano, aldrin, heptaclor, endosulfán) y hexaclorociclohexanos (lindano). Tienen menos toxicidad aguda que los plaguicidas que actúan contra la colinesterasa (organofosforados y carbamatos), pero tienen un potencial mayor para la toxicidad crónica [16].

Los plaguicidas organoclorados fueron ampliamente usados desde el final de la Segunda Guerra Mundial hasta los años 60 para el control de insectos en la agricultura, el suelo y dentro de edificaciones. Inicialmente, la persistencia de estos plaguicidas después de la aplicación era un beneficio considerable, ya que se controlaba a la plaga por un periodo de tiempo más largo. Pero con el tiempo se convirtió en un problema, ya que esa persistencia favorece la incorporación del plaguicida a las cadenas tróficas, la acumulación en los tejidos grasos humanos y animales y la biomagnificación¹.

Los plaguicidas organoclorados analizados en este trabajo fueron: alfa-endosulfán, beta-endosulfán y su producto de degradación, endosulfán sulfato. Las propiedades de estos compuestos se presentan en la Tabla 1.1.

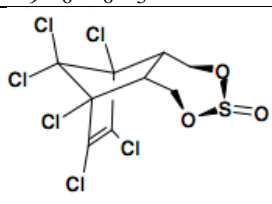
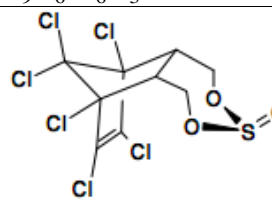
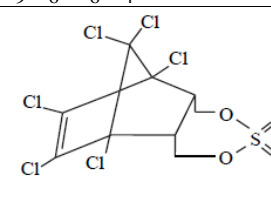
En casos de exposición oral aguda a dosis casi letales de endosulfán se ven afectados los sistemas respiratorio, cardiovascular, gastrointestinal, hematológico, hepático y renal.

¹ La biomagnificación es el proceso de acumulación progresiva de una sustancia tóxica a lo largo de la cadena trófica. Las concentraciones aumentan sucesivamente a medida que se asciende en la cadena.

Cuando la exposición es prolongada el hígado y los riñones son los órganos más afectados [17]. Los síntomas iniciales de envenenamiento con endosulfán son náuseas, vómito, diarrea, agitación, pérdida de la conciencia, cianosis, disnea, espuma en la boca y ruidos respiratorios. En las autopsias se encontraron edemas en los pulmones y cerebro, hemorragia en la capa medular de los riñones, enfisema pulmonar agudo y cromatolisis neuronal [17].

Tabla 1.1. Propiedades del endosulfán I, endosulfán II y endosulfán sulfato

(Fuente: ATSDR)

Plaguicida	Endosulfán I Alfa-Endosulfán	Endosulfán II Beta-Endosulfán	Endosulfán sulfato
Nombre IUPAC	6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6-9-metano-2,4,3benzodiazepin-3-óxido-alfa-isómero	6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6-9-metano-2,4,3benzodiazepin-3-óxido-beta-isómero	6,7,8,9,10,10-Hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodiazepin-3,3-dióxido
Fórmula	$C_9H_6Cl_6O_3S$	$C_9H_6Cl_6O_3S$	$C_9H_6Cl_6O_4S$
Estructura			
Clasificación toxicológica	II (moderadamente peligroso)	II (moderadamente peligroso)	II (moderadamente peligroso)
Modo de acción	De contacto	De contacto	De contacto
Peso molecular	406,93 g/mol	406,93 g/mol	422,93 g/mol
Estado físico	Sólido cristalino	Sólido cristalino	Sólido cristalino
Apariencia	Cristales incoloros (puro)	Cristales cerosos de color beige	Cristales de color café
Punto de fusión	106°C	207-209°C	181°C
Punto de ebullición	No hay información	No hay información	No hay información
Solubilidad en agua	0,53 mg/L (25°C)	0,28 mg/L (25°C)	0,117 mg/L (25°C)
Densidad	1,7 g/cm ³ (20 °C)	1,7 g/cm ³ (20 °C)	No hay información
Presión de vapor	1x10 ⁻⁵ mmHg (25°C)	1x10 ⁻⁵ mmHg (25°C)	1x10 ⁻⁵ mmHg (25°C)

1.2.2. PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS

Los plaguicidas organofosforados son compuestos hidrocarbonados que contienen al menos un átomo de fósforo en su estructura. Son normalmente ésteres, amidas o tioles, derivados del ácido fosfórico o del ácido fosfónico. En la Figura 1.1 se puede observar la estructura básica de un plaguicida organofosforado.

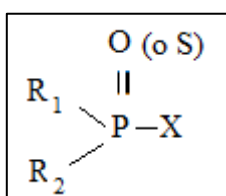


Figura 1.1. Estructura básica de un plaguicida organofosforado

Los radicales R_1 y R_2 son grupos alquílicos o arilos simples y pueden estar enlazados directamente al fósforo en los fosfinatos- o a través de un enlace -O- o -S- en los fosfatos. El radical X puede ser cualquier grupo alifático, aromático o heterocíclico unido al fósforo por un enlace lábil, -O- o -S-, y se denomina grupo saliente [18].

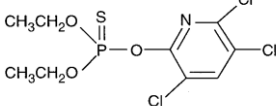
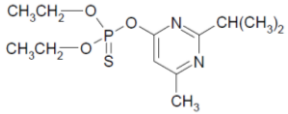
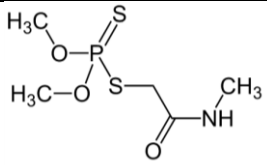
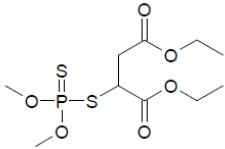
Los plaguicidas organofosforados son los más utilizados a nivel mundial, debido a que se degradan fácilmente y por lo tanto no son persistentes en el ambiente. En cambio, un gran número de plaguicidas organoclorados han sido prohibidos desde los años 70 por su persistencia y bioacumulación.

En la actualidad hay más de 100 productos registrados y todos se caracterizan por presentar el riesgo de una toxicidad aguda. Según la Asociación Americana de Centros de Control de Envenenamiento, los plaguicidas organofosforados están más a menudo relacionados con enfermedades sintomáticas. Presentan como acción general la inhibición de colinesterasa y provocan síntomas particulares: dolor de cabeza, náusea, mareo e incremento de sudoración, salivación, lagrimeo y secreciones respiratorias. Entre los síntomas progresivos, se encuentran fasciculaciones, debilidad, temblor, falta de coordinación, vómito, calambres abdominales y diarrea. Algunas víctimas pueden presentar visión alterada (borrosa u oscura). Los síntomas aparecen más rápidamente cuando la exposición a plaguicidas organofosforados es por inhalación, seguida por la vía gastrointestinal y finalmente por la vía dérmica [19].

Adicionalmente se tiene evidencia de que muchos plaguicidas organofosforados tienen efectos endócrinos. El malatión inhibe la secreción de catecolaminas y se une a los receptores de la hormona tiroidea. El dimetoato trastorna la acción de la hormona tiroidea y, además, aumenta la concentración de insulina a la vez que disminuye la concentración de la hormona luteína (LH) en la sangre. El clorpirifós inhibe la actividad andrógena [20].

En este trabajo se analizaron los siguientes plaguicidas organofosforados: clorpirifós, diazinón, dimetoato y malatión. Las propiedades de estos compuestos se presentan en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Propiedades del clorpirifós, diazinón, dimetoato y malatión (Fuente: ATSDR)

Plaguicida	Clorpirifós	Diazinón	Dimetoato	Malatión
Nombre IUPAC	O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato	O,O-dietil O-2-isopropil-6-methylpirimidin-4-il fosforotioato	O,O-dimetil S-[2-(methilamino)-2-oxoethyl] ditiofosfato	Dietil (dimetoxitiofosforiltio) succinato
Fórmula química	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂
Estructura				
Clasificación toxicológica	II (moderadamente peligroso)	II (moderadamente peligroso)	II (moderadamente peligroso)	III (ligeramente peligroso)
Modo de acción	De contacto	De contacto	Sistémico	De contacto
Peso molecular	350,57 g/mol	304,35 g/mol	229,26 g/mol	330,36 g/mol
Estado físico	Sólido cristalino	Líquido	Sólido	Líquido
Apariencia	Cristales granulares blancos	Incoloro (puro), ámbar a café (formulaciones)	Cristales granulares blancos	Incoloro (puro), café oscuro a amarillo (formulaciones)
Punto de fusión	41-42 °C	No hay información	43-45 °C	2,9°C
Punto de ebullición	Se descompone aproximadamente a 160°C	87°C (a 0.05 mmHg) Se descompone a 120°C	117 ° C (a 0.08 mmHg)	156-157°C
Solubilidad en agua	0,7 mg/L (20 °C) ; 2 mg/L (25°C)	40 mg/L (20°C)	25 g/L (21°C)	145 mg/L (20 °C)
Densidad	1,4 g/cm ³ (43,5 °C)	1,1 g/cm ³ (20°C)	1,3 g/cm ³ (25°C)	1,2 g/cm ³ (25 °C)
Presión de vapor	1,87 x 10 ⁻⁵ mmHg (25 °C)	9,01 x 10 ⁻⁵ mmHg (20 °C)	8,25 x 10 ⁻⁶ mmHg (25°C)	5,03x10 ⁻⁶ mmHg (25 °C)

1.2.3. PIRETRINAS Y PIRETROIDES

Las piretrinas son compuestos orgánicos que tienen actividad insecticida. Proviene de las flores de crisantemo, *Chrysanthemum cinerariaefolium* y *Chrysanthemum coccineum*. Alteran la función nerviosa, causando parálisis en los insectos y finalmente la muerte. Existen seis piretrinas que tienen efecto insecticida: piretrina 1, piretrina 2, cinerina 1, cinerina 2, jasmolina 1 y jasmolina 2 [21].

Los piretroides son insecticidas sintéticos cuyas estructuras químicas han sido adaptadas a partir de las piretrinas y actúan de forma similar. Los piretroides son modificados químicamente para aumentar su estabilidad ante la luz solar. Existen más de 20 piretroides, entre los cuales se encuentran, por ejemplo: bifentrina, ciflutrina, cipermetrina, cifenotrina, deltametrina, cihalotrina, permetrina, tetrametrina [21].

Las piretrinas y piretroides se encuentran en más de 3500 productos registrados, muchos de los cuales son usados en la agricultura y en los hogares, para el control de mosquitos y de plagas en animales. El uso de estos insecticidas ha aumentado durante la última década, provocando la disminución del uso de plaguicidas organofosforados, que son más tóxicos para pájaros y mamíferos que los piretroides.

En este estudio se analizó el piretroide alfa-cipermetrina. En la Tabla 1.3 se presentan las propiedades de este compuesto.

La exposición aguda a alfa-cipermetrina afecta al sistema neuromuscular. Los síntomas, que se presentan de forma temporal, son anomalías en la forma de caminar, temblores,

actividad motriz reducida y convulsiones. Éstos son más fuertes cuando el contacto es por vía oral [22].

Tabla 1.3. Propiedades de la alfa-cipermetrina (Fuente: ATSDR)

Plaguicida	Alfa-cipermetrina
Nombre IUPAC	Mezcla racémica de: (<i>S</i>)- α -ciano-3-fenoxibenzil-(1 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato y (<i>R</i>)- α -ciano-3-fenoxibenzil-(1 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato
Fórmula química	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃
Estructura	
Clasificación toxicológica	II (moderadamente peligroso)
Modo de acción	De contacto
Peso molecular	416,30 g/mol
Estado físico	Sólido cristalino
Apariencia	Cristales granulares blancos o color crema
Punto de fusión	78-80 °C
Punto de ebullición	Se descompone a 218-221 °C
Solubilidad en agua	0,01 mg/L (20 °C)
Densidad	1,3 g/cm ³ (25 °C)
Presión de vapor	2,89 x 10 ⁻⁷ mmHg (20 °C)

1.3. REQUISITOS DE CALIDAD DEL BRÓCOLI

El brócoli debe reunir los requisitos de calidad establecidos en la Norma Técnica Ecuatoriana del Instituto Ecuatoriano de Normalización NTE INEN 1976:2003 (ver Anexo 1). Las pellas de brócoli deben tener ciertas características físicas, como estar enteras, sanas, libres de ataques de insectos y enfermedades, sin magulladuras, manchas oscuras, lesiones, quemaduras de sol ni cicatrices. Su aspecto debe ser fresco y turgente, con el olor, sabor y color típico de la variedad. Deben estar exentas de materias extrañas visibles como restos de hojas, polvo, tierra, agroquímicos y otros [23].

Además del aspecto, la calidad de las pellas de brócoli se determina por la cantidad de residuos de plaguicidas. Debido a que desde el 2003 no se han emitido las normas correspondientes, se adoptarán las recomendaciones del Codex Alimentarius o las exigidas por el país de destino [23].

1.3.1. LÍMITES MÁXIMOS RESIDUALES

Un requisito de calidad con respecto a los residuos de plaguicidas está dado por el límite máximo residual (LMR). El LMR indica la concentración máxima de residuos de un plaguicida, expresada en mg/kg, que puede estar presente en productos alimenticios para consumo humano. Significa que cuando un producto alimenticio tiene una concentración menor al LMR no presenta riesgos para su consumo. El LMR es establecido por la Comisión del Codex Alimentarius o por organismos de control, como

la EPA en Estados Unidos o la SANCO (Dirección General de la Salud y Protección de los Consumidores) de la Unión Europea.

Los LMR se basan en datos de buenas prácticas agrícolas y tienen como objetivo lograr que los alimentos, tanto crudos como procesados, sean toxicológicamente aceptables.

Los LMR del Codex se obtienen basándose en estimaciones hechas por la Joint Meeting on Pesticide Residues (JMPR). Primero se realiza la evaluación toxicológica del plaguicida y su residuo. Luego se analizan los datos de residuos obtenidos en ensayos supervisados, en los cuales se usa la concentración más elevada recomendada, autorizada o registrada en el país, simulando las buenas prácticas agrícolas [24].

En la Tabla 1.4 se presentan los diversos LMR de los plaguicidas estudiados para el brócoli, establecidos por el Codex Alimentarius, la EPA y la SANCO.

Tabla 1.4. Límites Máximos Residuales para brócoli

(Fuente: USDA International MRL Database)

Plaguicida	Codex Alimentarius (mg/kg)	EPA (mg/kg)	SANCO (mg/kg)
Cipermetrina	1,0	2,0	1
Clorpirifós	2,0	1,0	0,05
Diazinón	0,5	0,7	0,01
Dimetoato	-	2,0	0,01 ²
Endosulfán (suma de alfa-; beta- y -sulfato)	-	3,0	0,05
Malatión	-	8,0	0,02

² La SANCO no ha establecido un LMR específico para el dimetoato en brócoli, pero tiene un LMR de 0,01 mg/kg aplicable por defecto.

1.3.2. CONTROL Y MONITOREO DE PLAGUICIDAS EN EL ECUADOR

El Ecuador es un país agrícola y los plaguicidas son usados para controlar los diferentes tipos de plagas que atacan a los cultivos. Sin embargo, estos productos se aplican sin mayor control y sin seguir procedimientos adecuados, lo cual incide en la salud de los consumidores y la contaminación ambiental.

Muchos agricultores usan plaguicidas inadecuados debido a que no identifican la plaga que afecta a los cultivos. Además, tienden a escoger los plaguicidas más baratos o los más tóxicos, creyendo que éstos son los más adecuados. El resultado de estas prácticas es una contaminación mayor de los productos alimenticios.

Actualmente en el país no se cuenta con un programa de monitoreo de residuos de plaguicidas. Sin embargo, sí existe un control de la calidad de formulaciones de plaguicidas antes de ingresar al mercado, pero todavía no se realizan controles periódicos de éstas en mostradores. Se cree que por el mercado informal ingresa una gran cantidad de plaguicidas prohibidos por el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca.

Si bien el brócoli es principalmente un producto de exportación, es decir que cumple con la legislación de residuos químicos del país de destino, queda la incógnita del estado del brócoli que se vende en los mercados ecuatorianos.

1.4. ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS

Para el análisis de plaguicidas, se han utilizado tanto técnicas clásicas como la gravimetría y la volumetría, cuanto técnicas instrumentales como la espectrofotometría y la cromatografía [25]. En los últimos años, la cromatografía ha sido la técnica más utilizada, siendo la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta eficiencia las más comunes. En este trabajo se empleó la cromatografía de gases. A continuación se revisarán los aspectos prácticos de esta técnica.

1.4.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía de gases es una técnica analítica de separación, en la cual los componentes de una muestra se reparten entre una fase móvil gaseosa, llamada gas portador, y una fase estacionaria contenida en una columna [26].

Cuando la muestra pasa a través de la columna algunos componentes son fuertemente retenidos por la fase estacionaria, razón por la que migran lentamente con el gas portador; otros compuestos están unidos débilmente a la fase estacionaria y migran con rapidez. Como consecuencia de las diferentes velocidades de migración, los componentes de la muestra se separan y llegan a un detector, creando una señal que se registra como un cromatograma que proporciona información cualitativa y cuantitativa [26].

La velocidad de migración de cada componente depende de la naturaleza del componente y su afinidad por la fase estacionaria, del flujo del gas portador y de la

temperatura de la columna. Por esto, la columna se encuentra dentro de un horno con programación de temperatura.

En un cromatógrafo de gases la muestra se inyecta, se volatiliza en una cámara y luego es introducida en la columna cromatográfica. Los componentes de la muestra se separan y son detectados mediante un detector cuya respuesta depende de la composición del vapor.

Para el análisis de plaguicidas, se emplean varios detectores, como el detector de ionización de llama (FID), detector de captura de electrones (ECD), detector termoiónico (NPD), detector fotométrico de llama (FPD), detector de conductividad electrolítica (ELCD) y el detector de espectrometría de masas (MSD). Este último fue el que se empleó en este estudio.

1.4.2. DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

En los últimos 10 años el uso del detector por espectrometría de masas se ha popularizado, debido a que es un detector universal y específico que permite detectar concentraciones del orden de partes por millón ($\mu\text{l/L}$) o partes por billón (nl/L) y en algunos casos se puede llegar hasta partes por trillón (pl/L). Pero principalmente porque permite identificar un compuesto de forma prácticamente inequívoca, ya que proporciona un espectro de masas característico de cada molécula [27]. El espectro de

masas es un gráfico de barras, que ilustra intensidad o abundancia versus la relación masa/carga (m/z)³.

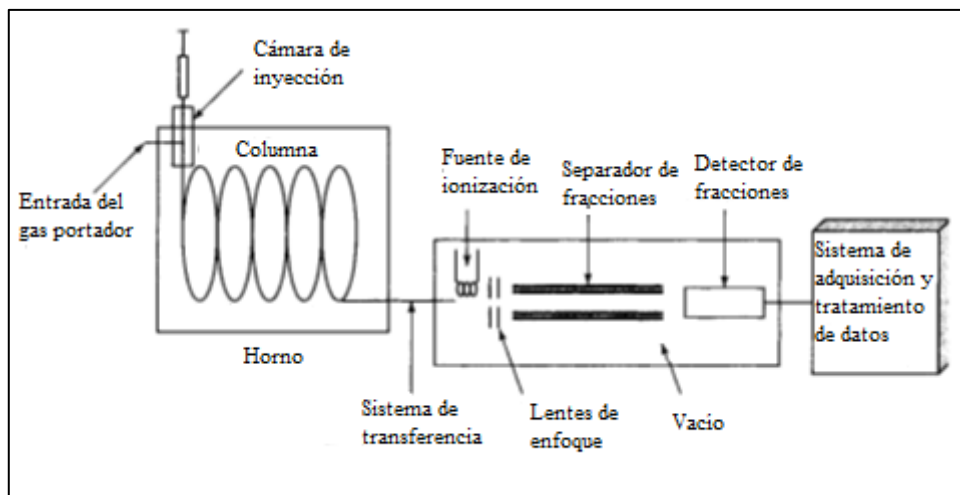


Figura 1.2. Esquema de un cromatógrafo de gases acoplado a un detector por espectrometría de masas

En la Figura 1.2 se aprecia el esquema de un cromatógrafo de gases acoplado a un detector por espectrometría de masas. Este detector se compone de:

- Una fuente de ionización en la que se generan iones a partir de la muestra. La ionización se da por impacto electrónico, que consiste en bombardear la molécula con electrones de alta energía, lo cual expulsa un electrón y resulta en un ion molecular. Las moléculas ionizadas que tienen exceso de energía se pueden fragmentar. La naturaleza del ion o fragmento, así como la proporción relativa de cada uno de éstos, son características de cada molécula, es decir que dos moléculas no generan los mismos iones con las mismas proporciones [27].

³ En el Anexo 7 se pueden observar los espectros de masas de los ocho analitos, en los cuales se grafica abundancia versus relación masa/carga.

- Un separador de fracciones o analizador de masas que separa los iones según su relación masa/carga. Los iones son acelerados mediante campos eléctricos o magnéticos hacia un sistema colector, donde son separados debido a su masa y su carga: la velocidad alcanzada por cada ion es dependiente de su masa. El analizador más común es el cuadrupolo, que consiste en 4 barras conectadas eléctricamente entre sí en pares opuestos [27, 28].
- Un detector que emite señales eléctricas cuando un ion que emerge del analizador choca contra el multiplicador de electrones: la detección de cada ion formado a partir de las moléculas del compuesto produce el espectro de masas de la sustancia, que constituye una identificación prácticamente inequívoca del compuesto analizado [27, 28].

El detector, además de proporcionar los espectros de masa de cada compuesto, genera un cromatograma o TIC (“Total Ion Current”). También se puede programar al detector para que detecte y cuantifique compuestos preseleccionados en la muestra. Esta técnica de detección es conocida como SIM (“Selected Ion Monitoring”) y permite aumentar la especificidad y sensibilidad de método, reduciendo las interferencias [27].

La ionización, la separación y la detección se dan en condiciones de alto vacío (10^{-5} - 10^{-8} torr) para evitar que los iones choquen con otras moléculas gaseosas y se desvíen de su trayectoria hacia el detector o reaccionen entre sí [28].

1.5. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

El objetivo principal de la validación de un método analítico es demostrar que el método proporciona resultados confiables y que es adecuado para su finalidad y propósito. Por lo tanto, la validación asegura la calidad de los resultados.

Según la norma ISO/IEC 17025, la validación de un método analítico es “la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto”.

Esta norma establece que en un laboratorio se deben validar “los métodos no normalizados, los métodos que [se] diseñan o desarrollan, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto”. Toda la validación debe estar acompañada de registros de los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto, ya que estos son la prueba de que se realizó la validación. Adicionalmente, el laboratorio debe validar todo el procedimiento analítico teniendo en cuenta el intervalo de concentraciones y la matriz de las muestras.

Antes de validar el método es necesario estandarizarlo. La estandarización sirve para obtener un conocimiento general del método de ensayo. Se pone en funcionamiento el método de forma consistente y razonable, de tal manera que los resultados del proceso de medición se encuentren dentro de una distribución normal y que las variaciones se deban exclusivamente a errores aleatorios. De esta manera, en la estandarización se

procede a ajustar los parámetros instrumentales y los diferentes pasos y condiciones, controlar las variables de influencia y corregir y eliminar errores sistemáticos. El método estandarizado siempre se realizará de la misma manera, en cualquier momento y por cualquier analista [29].

Todo el proceso establecido para cumplir con el objetivo de la validación debe quedar descrito en un documento específico que, de acuerdo al sistema de calidad del laboratorio, puede ser un protocolo, un procedimiento o un instructivo. En este documento se deben definir: los objetivos y alcance de la validación, las etapas de la validación, el diseño experimental, los parámetros a validarse, los criterios de aceptación y rechazo y los cronogramas de trabajo [29].

En una validación, para poder evaluar el rendimiento de un método, se suelen medir los siguientes parámetros: selectividad/especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, exactitud, precisión e incertidumbre de la medición. En la Tabla 1.5 se define cada parámetro y se explica cómo se determina.

Tabla 1.5. Parámetros de validación de un método analítico

Parámetro	Definición	Determinación
Selectividad / especificidad	Aptitud de un método para determinar exacta y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes en la matriz de la muestra, bajo las condiciones establecidas del ensayo [29].	Si se utilizan procedimientos normalizados para una matriz específica, no se requiere validación. Si no, se estudia adicionando de manera deliberada a una muestra las interferencias que se crea tengan mayor probabilidad de estar presentes en las muestras.

Continúa Tabla 1.5.		
Límite de detección	Mínima concentración del analito que se puede detectar con fiabilidad cuando se aplica un método para el análisis de una muestra [30].	Existen varios criterios para su cuantificación, pero muchas veces se reporta como promedio de la lectura de blancos del método más tres veces su desviación estándar.
Límite de cuantificación	Mínima concentración de analito que se puede determinar con un nivel aceptable de precisión (repetibilidad) y exactitud [30].	Varias convenciones lo definen como la concentración de analito correspondiente al valor promedio de las lecturas del blanco más 5, 6 ó 10 desviaciones estándar.
Linealidad	Habilidad (dentro de un rango dado) de obtener resultados proporcionales a la concentración de un analito en la muestra [31].	Se mide a partir de la curva de calibración. Se realiza el cálculo de regresión.
Exactitud	Cercanía de un resultado al valor verdadero [30].	Se evalúa por comparación con valores de referencia de un material caracterizado (material de referencia), preferiblemente certificado.
Precisión	Medida de los errores aleatorios. [31]	Se expresa como repetibilidad y reproducibilidad
Repetibilidad	La proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando bajo las mismas condiciones de medición [32].	Se realizan varios análisis con el mismo método. Éste debe ser aplicado por un solo analista, en un mismo equipo y en intervalos cortos de tiempo.
Reproducibilidad	La proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando bajo condiciones de medición que cambian [32].	Una muestra es analizada por varios laboratorios. Sin embargo, para determinar la reproducibilidad dentro de un solo laboratorio, se puede emplear la precisión intermedia, que se obtiene cuando se evalúa la variabilidad entre analistas de un mismo laboratorio o en intervalos de tiempo más largos, por ejemplo entre días.
Incertidumbre de medición	Parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza [32]. Expresa el rango de valores posibles sobre la base del resultado de la medición.	La estimación de la incertidumbre de un método se calcula tomando en cuenta la precisión, exactitud, incertidumbre de calibración, incertidumbre del material de referencia y cualquier otro efecto significativo.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. INSTRUMENTACIÓN, REACTIVOS Y ESTÁNDARES

2.1.1. INSTRUMENTACIÓN

Las mediciones se realizaron mediante un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890-N, equipado con un detector selectivo de masas 5973-N (con fuente de impacto de electrones y cuadrupolo, que detecta un rango de masas de 1,6 a 800 uma) y un automuestreador 7683 Series. El cromatógrafo fue conectado a un computador HP, en el cual se instaló el software “MSD Productivity ChemStation”.

Para la preparación de soluciones los pesos se determinaron con una balanza analítica Mettler AE-240 ($\pm 0,0001$ g). Los volúmenes se midieron mediante micropipetas volumétricas marca Boeco de 10-100 μl y de 100-1000 μl . Para la homogenización se empleó un agitador Heidolph Reax Top. La densidad de las soluciones fue medida con un densímetro Densito 30PX (Mettler Toledo). Todas las soluciones se prepararon y guardaron en viales ámbar de 4 ml con tapa de rosca.

Para la preparación de las muestras se empleó una licuadora Oster de 10 velocidades y un procesador de alimentos Oster. Los pesos se determinaron con una balanza analítica Boeco Germany ($\pm 0,1$ g).

Para la inyección, las soluciones se trasvasaron a viales ámbar de 2 ml con septa de teflón/silicona (Waters).

2.1.2. REACTIVOS

En este estudio se empleó acetato de etilo grado pesticida (Fisher Scientific). El agua destilada y desionizada, con una resistividad específica de 18,2 M Ω .cm, se obtuvo de un sistema de purificación Direct-Q (Millipore).

Para el tratamiento de la muestra se empleó el DisQue® CEN Dispersive SPE Kit (Waters), que consta de:

- Tubo 1: tubo de 50 ml empleado para la extracción. Contiene 4 g de sulfato de magnesio anhidro, 1 g de cloruro de sodio, 1 g de citrato trisódico dihidratado, 0,5 g de hidrogenocitrato disódico sesquihidratado.
- Tubo 2: tubo de 2 ml empleado para el clean-up. Contiene 150 mg de sulfato de magnesio anhidro, 25 mg de PSA (amina primaria/secundaria), 25 mg de C₁₈ (octadecil).

2.1.3. ESTÁNDARES

En este estudio se utilizaron los siguientes estándares: alfa-cipermetrina (pureza: 99,7%, Pestanal®, Sigma-Aldrich), clorpirifós (pureza: 99,9%, Pestanal®, Sigma-Aldrich), diazinón (pureza: 99,5%, ChemService), dimetoato (pureza: 99,6, Pestanal®, Sigma-

Aldrich), malatión (pureza: 97,2%, Pestanal®, Sigma-Aldrich), CLP Organochlorine Pesticide Mix (pureza: >99%, Supelco).

2.2. MÉTODOS

El método desarrollado en este trabajo está basado en el estándar europeo EN 15662: “*Foods of plant origin — Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE — QuEChERS-method*”. Este método permite analizar un amplio rango de plaguicidas, que incluye organoclorados, organofosforados y piretroides. Por lo tanto es adecuado para el análisis de los 8 analitos de interés: alfa-cipermetrina, clorpirifós, diazinón, dimetoato, endosulfán I, endosulfán II, endosulfán sulfato y malatión.

El método comprende:

- la homogenización de la muestra,
- la extracción sólido/líquido con acetonitrilo: se añade MgSO₄ y NaCl para mejorar la partición, y sales sódicas de citrato para formar soluciones “buffer” que protejan los compuestos sensibles a pH alcalinos,
- la limpieza o “clean-up”, que consiste en una extracción en fase sólida dispersiva, en la cual se pueden usar varios adsorbentes, entre los cuales destacan:
 - PSA para eliminar ácidos orgánicos y pigmentos polares, además de otros productos;
 - C₁₈ para eliminar lípidos y esteroides

- la inyección del extracto y posterior identificación y cuantificación en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas.

En el método desarrollado en este trabajo se introdujo un cambio importante con respecto al EN 15662: en lugar de acetonitrilo, el solvente de extracción empleado fue acetato de etilo, cuya eficiencia para la extracción en el método QuEChERS ha sido comprobada [33].

La parte experimental comprende tres etapas: el desarrollo y estandarización del método, su validación y su aplicación. A continuación se detalla el procedimiento seguido en este trabajo.

2.2.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Para este estudio se prepararon tres tipos de soluciones con los estándares de plaguicidas:

- las soluciones stock de aproximadamente 100 ng/ μ l, preparadas en acetato de etilo,
- la solución madre de 10 ng/ μ l, que consiste en una mezcla de todos los plaguicidas en la misma concentración, preparada en acetato de etilo, y
- las soluciones de trabajo para la curva de calibración, preparadas en solución matriz de brócoli.

En el Anexo 2 se encuentran los certificados de análisis de los estándares de plaguicidas empleados. En el Anexo 3 se detallan los procedimientos para preparar los tres tipos de soluciones y la solución matriz de brócoli.

2.2.1. DESARROLLO Y ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO

El desarrollo y estandarización del método comprende la optimización del método cromatográfico en modo SCAN y en modo SIM, la cuantificación de los analitos y el tratamiento de las muestras que se describen a continuación.

2.2.2.1. Desarrollo y optimización del método cromatográfico en modo SCAN

Después de haber preparado las soluciones se desarrolló el método cromatográfico. Para esto se procedió a optimizar las condiciones cromatográficas. Se utilizó una columna capilar de alto rendimiento Zebron ZB-Multiresidue-1, cuya fase estacionaria separa todo tipo de plaguicidas y es ideal para el análisis de plaguicidas por GC-MS, debido a sus niveles bajos de sangrado, certificados para espectrometría de masas. Para desarrollar el método se realizó una primera inyección empleando la solución madre de 10 ng/ μ l con las condiciones expuestas en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Condiciones iniciales de operación del GC-MS

Columna	Phenomenex Zebron Zb-MR-1 Multiresiduo 30,0 m x 250 µm x 0,25 µm Temperatura de operación máxima: 320°C
Modo de inyección	Splitless
Gas portador	Helio
Flujo	1,0 ml/min
Detector	Espectrómetro de masas (MSD) en modo SCAN
Temperatura del horno	90°C (4 min) @ 10°C/min hasta 300°C (5 min) Post corrida: 2,00 min a 300°C Tiempo de corrida: 30 min Solvent delay ⁴ : 2,20 min
Temperatura del inyector	150°C
Temperatura del detector	Auxiliar: 300°C Fuente de iones: 230°C Cuadrupolo: 150°C
Volumen de inyección	1 µl
Solvente de inyección	Acetato de etilo

Luego se comprobó que en el cromatograma obtenido de esta primera inyección aparecieran los picos correspondientes a los 8 plaguicidas de interés y se compararon sus espectros de masas con los de la base de datos.

⁴ El alto flujo de corriente creado por la gran cantidad de solvente que eluye de la columna disminuye el tiempo de vida del filamento de ionización. Para evitar esto, existe una opción, el “solvent delay”, que permite apagar el filamento hasta que eluya el solvente. Así, el “solvent delay” establece el tiempo en el cual se prenderá el filamento.

Se optimizó la respuesta y la separación de los picos, inyectando nuevamente la solución madre cuantas veces fuere necesario, con diferentes condiciones de temperatura del inyector, programa de temperatura en la columna, volumen de inyección y flujo del gas portador.

2.2.2.2. Desarrollo del método cromatográfico en modo de monitoreo selectivo de iones

Una vez optimizado el método en modo SCAN, se desarrolló el modo SIM con la ayuda del software del equipo (MSD ChemStation Data Analysis), seleccionando el pico base⁵ y otros tres iones de alta abundancia (o el ion molecular) que aparecen en el espectro de masas de cada analito y asignando los intervalos de tiempo en los cuales el espectrómetro de masas debe detectarlos.

2.2.2.3. Cuantificación de los analitos

Para la cuantificación de los analitos, se definió el intervalo de trabajo de concentraciones en la muestra y se determinó las concentraciones de las seis soluciones de trabajo de la curva de calibración.

Se prepararon las soluciones de trabajo, siguiendo el procedimiento detallado en el Anexo 3 y se inyectaron las seis soluciones, empleando el método SIM obtenido de la

⁵ El pico base es el pico más intenso del espectro de masas, es decir el que tiene la mayor abundancia, y al que por convenio se le asigna una intensidad relativa de 100%.

parte 2.2.2.2. Utilizando el software del equipo, se creó un método de cuantificación y se elaboraron las curvas de calibración para cada plaguicida y se confirmó que existiese linealidad y un R^2 que tiende a 1.

2.2.2.4. Tratamiento de la muestra

El tratamiento de la muestra se hizo siguiendo el método EN 15662. En este trabajo se empleó el kit preparado por la corporación Waters, DisQue® CEN Dispersive SPE Kit.

Para determinar la eficacia de este método, se realizaron pruebas con muestras fortificadas. Para esto se prepararon tres muestras de brócoli fortificadas de 0,5 mg/kg: a los 10 g de brócoli homogenizado se añadió 500 μ l de solución madre de 10 ng/ μ l. Se esperó 15 minutos antes de añadir los 10 ml de solvente. La muestra fue tratada aplicando el procedimiento de preparación de muestra sugerido por el fabricante (ver Anexo 4), remplazando el acetonitrilo por acetato de etilo.

Posteriormente se inyectaron los extractos de las muestras fortificadas junto con las seis soluciones para la curva de calibración y se cuantificaron las muestras. Al calcular los porcentajes de recuperación, se obtuvieron porcentajes de entre 40 y 50%, muy por debajo del rango ideal que es de 70 a 120%. El problema estaba en el tamaño de partícula obtenido en la homogenización: la muestra de brócoli fue triturada en un procesador de alimentos y el tamaño de partícula era de 1 mm de diámetro aproximadamente.

Para reducir el tamaño de partícula se licuó la muestra triturada de brócoli con agua destilada. Se probaron varias relaciones agua:brócoli y varios tiempos de licuado, a diferentes velocidades. La mejor relación agua:brócoli fue 1:1 y, licuando durante 5 minutos a velocidad media, se obtuvo un tamaño de partícula mucho menor (inapreciable a simple vista). De esta manera realizando nuevos ensayos de recuperación, con tres muestras fortificadas de 0,5 mg/kg, se obtuvieron porcentajes de recuperación en el rango de 70 a 120%, como se podrá constatar más adelante en la sección de validación y en los resúmenes de validación en el Anexo 9. Así, se estableció el procedimiento definitivo para la preparación de las muestras de brócoli. En el Anexo 5 se encuentra el diagrama de flujo de este procedimiento.

2.2.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Para la validación del método “*Determinación de residuos de plaguicidas en brócoli por Cromatografía de Gases con detección por Espectrometría de Masas*” se siguieron los requisitos técnicos de la norma NTE-ISO/IEC 17025, *Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración*, y el modelo propuesto por el Instituto Ecuatoriano de Normalización. Se validó tanto el proceso de medición analítica como la etapa de tratamiento de la muestra, para los 8 analitos de manera idéntica y simultánea.

En primer lugar se prepararon las soluciones stock, la solución madre de 10 ng/μl y las seis soluciones de trabajo para la curva de calibración, siguiendo el procedimiento detallado en el Anexo 3 y se determinó la exactitud en la preparación de las soluciones.

Después se inyectaron las seis soluciones de trabajo por triplicado durante cinco días consecutivos y se realizó un análisis estadístico, en el cual se determinó la linealidad y función de respuesta, precisión e incertidumbre de medición para cada analito.

Para calcular los límites de detección y cuantificación, se inyectaron 10 blancos de solución matriz de brócoli, junto con las seis soluciones de trabajo para la cuantificación.

Finalmente, se prepararon 5 muestras fortificadas a tres niveles de fortificación: 0,05; 0,50 y 1,50 mg/kg, cuya concentración real se calculó a partir de los pesos obtenidos durante el proceso de preparación. Se inyectaron los 15 extractos obtenidos, junto con las seis soluciones de trabajo, y se calcularon los porcentajes de recuperación para cada analito en cada nivel de fortificación.

Las fórmulas para calcular la exactitud en la preparación de las soluciones, la linealidad y función de respuesta, precisión e incertidumbre de medición para cada analito se detallan en el Anexo 6.

2.2.4. APLICACIÓN DEL MÉTODO

Para establecer la aplicabilidad del método desarrollado y validado, se analizaron muestras seleccionadas de acuerdo a un plan de muestreo en el cual se establecieron los centros de comercialización de brócoli, la cantidad de muestra y la periodicidad de la toma de muestras, ajustándose a las pautas establecidas en los “Métodos de muestreo recomendados para la determinación de residuos de plaguicidas a efectos del cumplimiento de los Límites Máximos Residuales (LMR)” (referencia CAG/GL 33).

Las muestras tomadas fueron analizadas tomando en cuenta las “Directrices sobre buenas prácticas de laboratorio en el análisis de residuos de plaguicidas” (referencia CAG/GL 40) del Codex Alimentarius.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. DESARROLLO Y ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO

3.1.1. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO EN MODO SCAN

De la primera inyección realizada con las condiciones de la Tabla 2.1 se obtuvo un cromatograma en el que se distinguen ocho picos en un tiempo de corrida de 30 minutos (ver Figura 3.1). Con la ayuda de la base de datos de espectros de masa del software (Biblioteca WILEY 275) estos picos se identificaron. Los espectros de estos picos correspondieron a los plaguicidas de interés. En el Anexo 7 se observan los espectros obtenidos para cada estándar de plaguicida presente en la solución madre y las estructuras de los dos iones más abundantes. En la Tabla 3.1 se presenta el orden en que aparecieron los picos, el componente identificado por el software y el porcentaje de similitud con el espectro de referencia.

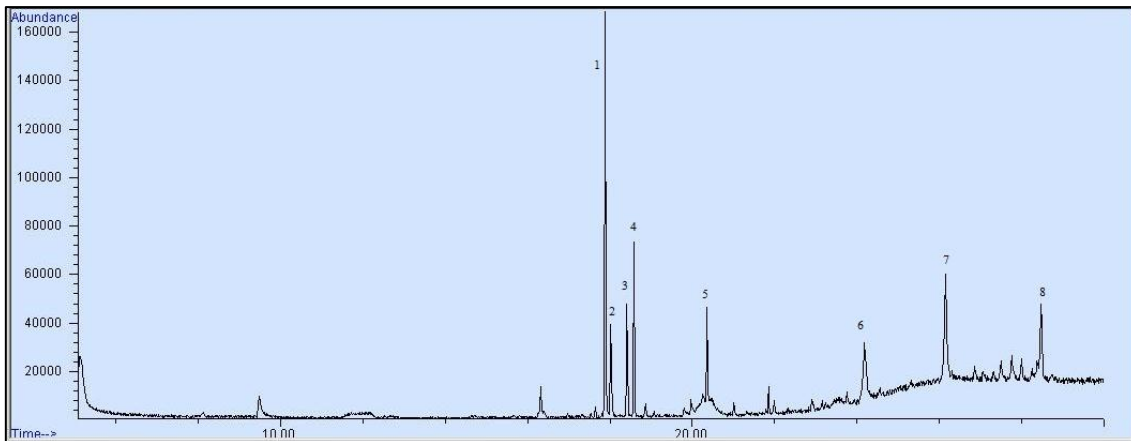


Figura 3.1. Cromatograma obtenido de la primera inyección

Tabla 3.1. Componente identificado y porcentaje de similitud

Número de pico	Compuesto	Porcentaje de similitud
1	Dimetoato	96
2	Diazinón	99
3	Malatión	91
4	Clorpirifós	99
5	Endosulfán I	94
6	Endosulfán II	99
7	Endosulfán Sulfato	99
8	Alfa-cipermetrina	99

Esta corrida mostró que efectivamente la columna tiene la capacidad de separar los analitos de interés. Se procedió entonces a optimizar el método, modificando varios parámetros para obtener la máxima resolución, en el menor tiempo de corrida, con las mejores respuestas posibles.

El primer parámetro que se modificó fue la temperatura del inyector, para determinar la influencia de la temperatura en el tamaño de los picos. A continuación se hicieron varias pruebas modificando las rampas de temperatura para establecer cuál es el efecto de la temperatura en la resolución de los picos. También se realizó una prueba cambiando el flujo. Finalmente, para determinar la capacidad de la columna se realizaron unas últimas pruebas variando el volumen de inyección.

Adicionalmente se modificó el tiempo de post-corrída y el solvent delay. El tiempo de post-corrída era originalmente de 2 minutos, pero se aumentó a 6 minutos debido a que la columna no se limpiaba completamente al cabo de dos minutos. Esto afectaba en la siguiente corrída causando la aparición de picos adicionales en el cromatograma. El solvent delay se movió a 12,20 minutos, teniendo en cuenta que el primer plaguicida de interés aparece a los 12,47 minutos.

De esta manera se establecieron las condiciones óptimas de operación (ver Tabla 3.2). Este método se denominó BROCOLISCANDEFINITIVO y con éste se obtuvieron los tiempos de retención que se presentan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.2. Condiciones de operación óptimas para el análisis de siete plaguicidas por GC-MS

Columna	Phenomenex Zb-MR-1 Multiresiduo 30,0 m x 250 μ m x 0,25 μ m
Modo de inyección	Splitless
Gas portador	Helio
Flujo	1,5 ml/min

Continúa Tabla 3.2.	
Detector	Espectrómetro de masas (MSD)
Temperatura del horno	90°C (4 min) @ 25°C/min hasta 180°C (4 min) @ 40°C/min hasta 300°C (3.5 min) Post corrida: 6,00 min a 300°C Tiempo de corrida: 18,10 min Solvent delay: 12,20 min
Temperatura del inyector	250°C
Temperatura del detector	Auxiliar: 300°C Fuente de iones: 230°C Cuadrupolo: 150°C
Volumen de inyección	4 µl

Tabla 3.3. Tiempos de retención de los 8 analitos bajo condiciones óptimas de operación

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Dimetoato	12,47
Diazinón	12,55
Malatión	13,77
Clorpirifós	13,84
Endosulfán I	14,59
Endosulfán II	15,17
Endosulfán Sulfato	15,48
Alfa-cipermetrina	17,48

3.1.2. DESARROLLO DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO EN MODO DE MONITOREO SELECTIVO DE IONES

Después de haber optimizado el método en modo SCAN, se procedió a cambiarlo a modo SIM (Monitoreo Selectivo de Iones) con el fin de incrementar la especificidad y sensibilidad del método y reducir las interferencias. En el modo SIM, a diferencia del modo SCAN, el detector de masas no está realizando un barrido continuo, sino que monitorea sólo unos pocos iones seleccionados. De esta manera, la identificación del analito ya no se da por comparación del espectro de masas completo, sino sólo de los cuatro iones seleccionados para cada analito y sus abundancias relativas.

A continuación se describen los criterios tomados para la selección de los cuatro iones de cada analito.

Para el dimetoato, el diazinón y el endosulfán sulfato, el primer ion seleccionado fue el del pico base. Luego se seleccionaron los picos del segundo y tercer ion más abundantes y finalmente, para el cuarto ion, se seleccionó el pico del ion molecular.

En el caso del malatión, clorpirifós y cipermetrina se seleccionó primero el ion del pico base. Después se seleccionaron los tres iones de mayor abundancia. No se seleccionó el ion molecular debido a que, en el espectro del malatión, éste no existe y, en el caso del clorpirifós y la cipermetrina, su abundancia relativa es menor al 5%.

Para el endosulfán I y el endosulfán II, el primer ion seleccionado fue el del pico base. El segundo ion seleccionado corresponde al segundo ion de mayor abundancia. La

selección de los iones 3 y 4 se basaron en la frecuencia con la que aparecen en la literatura. Se tuvo especial cuidado de no seleccionar el ion 207, debido a que éste corresponde al pico base de los dimetilsiloxanos, compuestos que aparecen en los cromatogramas cuando hay sangrado de la columna.

De esta manera, se creó el método BROCOLISIMDEFINITIVO, cuyos parámetros se presentan en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Parámetros del método BROCOLISIMDEFINITIVO

Intervalo de tiempo (min)	Compuesto	Ion 1	Ion 2	Ion 3	Ion 4	Nombre del grupo	Número de iones por intervalo
12,20-12,70	Dimetoato	87	93	125	229*	DIMEDIAZ	8
	Diazinón	179	137	152	304*		
12,70-13,70	A	290	291	293	296	A	4
13,70-13,91	Malatión	173	125	127	93	MALCLORP	8
	Clorpirifós	199	197	97	314		
13,91-14,54	B	290	291	293	296	B	4
14,54-14,77	Endosulfán I	241	195	170	339	ENDO1	4
14,77-15,14	C	290	291	293	296	C	4
15,14-15,24	Endosulfán II	195	237	159	265	ENDO2	4
15,24-17,20	Endosulfán Sulfato	272	274	229	422*	ENDOSULFATO	4
17,20-18,10	Alfa-cipermetrina	163	181	165	91	CIPER	4

Nota: Los iones con asterisco son iones moleculares.

Como se puede observar en la tabla 3.4, los grupos DIMEDIAZ y MALCLORP contienen ocho iones en lugar de cuatro. Esto se debe a que los picos del dimetoato y

del diazinón, al igual que los del malatión y el clorpirifós, no se encuentran lo suficientemente separados y no se puede crear un intervalo para cada pico.

Adicionalmente se crearon tres intervalos de tiempo (A, B y C) en los cuales se analizan los mismos iones. Estos iones son los de menor abundancia que aparecen en el espectro de la línea base en modo SCAN. Estos intervalos se crearon para evitar que picos de gran área, causados por interferencias y compuestos propios de la matriz, aparezcan en el cromatograma.

De esta manera, se logró desarrollar y optimizar un método cromatográfico que permite separar y analizar los ocho plaguicidas de interés en 18,10 minutos. La Figura 3.2 muestra el cromatograma en el cual se aprecia la separación de los ocho analitos obtenida con el método BROCOLISIMDEFINITIVO.

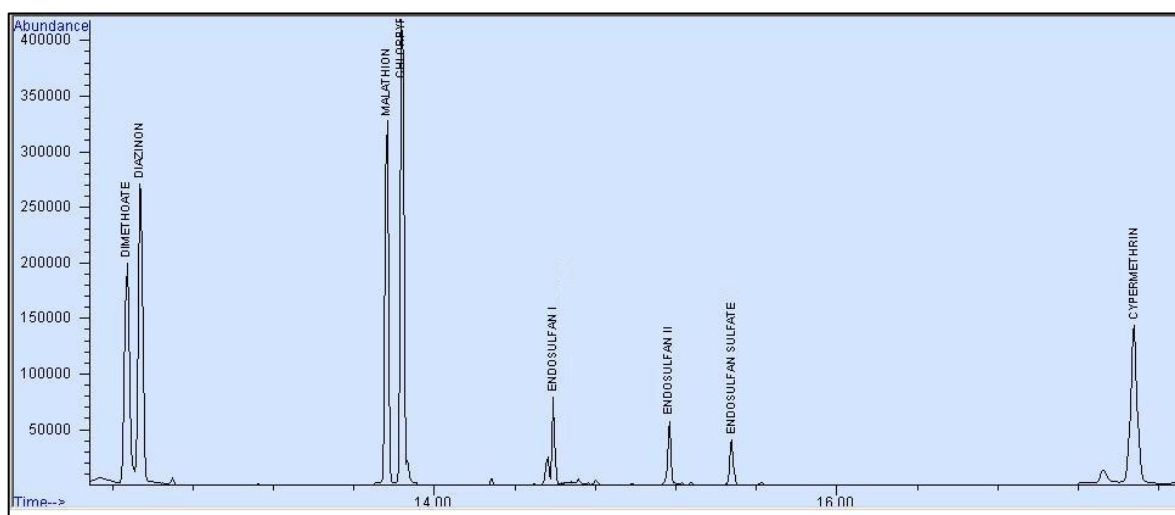


Figura 3.2. Separación de los ocho analitos con el método SIM

3.1.3. CUANTIFICACIÓN

3.1.3.1. Intervalo de trabajo en la muestra

La norma NTE INEN 1976 establece que se deben tomar como referencia los LMR establecidos por el Codex Alimentarius. Sin embargo, esta entidad no tiene LMR definidos para todos los plaguicidas de interés en este trabajo, sino solo para cipermetrina, clorpirifós y diazinón (1,0; 2,0 y 0,5 mg/kg, respectivamente). Es por esto que también se tomaron en cuenta los LMR establecidos por la SANCO para el endosulfán y el malatión (0,05 y 0,02 mg/kg, respectivamente), que son mucho más estrictos que los del Codex. Debido a que hay un plaguicida (dimetoato) que no tiene un LMR definido por la SANCO, se tomó en cuenta el LMR establecido por la EPA para ese plaguicida, que es 2,0 mg/kg (ver Tabla 1.4). De esta manera el intervalo establecido para los plaguicidas estudiados fue de 0,02 mg/kg a 2,00 mg/kg.

3.1.3.2. Curva de calibración

La curva de calibración debe cubrir el intervalo de trabajo definido para la muestra, en este caso, 0,02 mg/kg a 2,00 mg/kg. Para establecer el rango de concentración cubierto por la curva de calibración se realizó la siguiente consideración:

En la etapa de extracción la relación muestra solvente es 1:1 (10 ml de solvente por 10 g de brócoli). Esto significa que, si hay una concentración de X mg/kg de plaguicida, en

los 10 g de muestra habrá 0,01X mg de plaguicida. Asumiendo una extracción total de los plaguicidas estos 0,01X mg serán extraídos en los 10 ml de solvente, obteniendo así una concentración de 0,001X mg/ml, es decir: X mg/L. Puesto que en el cromatógrafo se inyectan volúmenes del orden de los μl , es preferible transformar mg/L a ng/ μl , obteniendo una concentración de X ng/ μl .

De esta manera, una concentración de 0,10 mg/kg en la muestra se traduce como 0,10 ng/ μl en la lectura cromatográfica. Por lo tanto el rango de la curva de calibración es desde 0,02 ng/ μl hasta 2,00 ng/ μl .

Tras inyectar las seis soluciones se generaron las curvas de calibración para cada plaguicida. Todas presentaron R^2 mayores a 0,997. En la figura 3.3 se observa la curva de calibración del dimetoato generada por el software (las unidades del eje X son ng/ μl). Las curvas de calibración para cada analito se presentan en el Anexo 8⁶.

⁶ Las curvas de calibración del Anexo 8 son las primeras curvas obtenidas. Con éstas se determinó si el rango de trabajo de la curva es adecuado, es decir si la respuesta es lineal en este rango

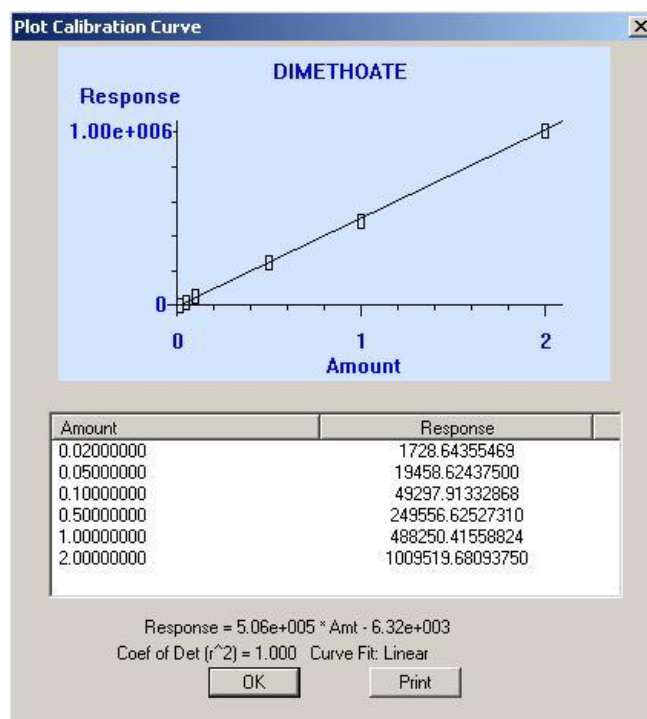


Figura 3.3. Curva de calibración del dimetoato generada por el software

El método de cuantificación emplea estas curvas de calibración y genera un reporte, en el cual consta el analito, su tiempo de retención, su ion principal, su respuesta, su concentración y su “Q value”⁷. En el reporte aparecen también los analitos no detectados (en este caso, la concentración se expresa como “N.D.”) y los analitos detectados pero cuya concentración es menor al límite de cuantificación.

Es importante recalcar que si la concentración del analito está fuera del rango de la curva de calibración, este valor no puede reportarse en el informe de resultados. En el caso de que sea menor al límite inferior de la curva se debe reportar como menor al límite de cuantificación (<LC). Si la concentración es mayor al límite superior, debido a

⁷ El “Q value” es un valor entre 0 y 100 que expresa el porcentaje de similitud entre las relaciones de los 4 iones monitoreados del estándar y las relaciones de los 4 iones monitoreados del compuesto detectado en la muestra. De esta manera el “Q value” permite verificar la identidad del compuesto detectado.

que la linealidad se garantiza sólo dentro del intervalo de la curva, se debe diluir el extracto (tomando como referencia la concentración reportada originalmente) de tal forma que la concentración de la solución diluida se encuentre dentro del intervalo. Esta solución se inyecta y cuantifica. Para reportar la concentración en la muestra se multiplica la concentración de la solución diluida por el factor de dilución.

3.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

A continuación se detalla la validación del método para el plaguicida *dimetoato*. Primero se presentarán los resultados de la preparación de las soluciones estándar, seguido por la validación del método cromatográfico en la que se validan: función de respuesta y linealidad, precisión, incertidumbre, límites de detección y cuantificación; y finalmente la validación del tratamiento de la muestra, en la que se validan las tasas de recuperación de tres niveles de fortificación y sus respectivas desviaciones estándar relativas.

3.2.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ESTÁNDAR

3.2.1.1. Solución Stock

Empleando la ecuación A3.1⁸, se calcularon las concentraciones de las soluciones stock, que se reportan en la Tabla 3.5.

⁸ A3.1: Anexo 3 – ecuación 1

Tabla 3.5. Concentraciones de las soluciones stock empleadas en la validación

DESCRIPCION	Soluciones Stock						
	Vial vacío (g)	Vial + estándar (g)	Vial + estándar + solvente (g)	Pureza (%)	Producto real (ng)	Solución final (μl)	Concentración final (ng/μl)
Clorpirifós	5,9701	5,9718	9,5028	99,9	1698300	3943	431
Cipermetrina	5,9544	5,9552	9,4674	95,7	765600	3921	195
Diazinón	5,9674	5,9708	9,4730	99,5	3383000	3912	865
Dimetoato	5,9723	5,9735	9,4887	99,6	1195200	3925	305
Endosulfán I	5,9598	6,0887	9,3078	99,9	348904	3738	93
Endosulfán II	5,9598	6,0887	9,3078	99,9	340322	3738	91
Endosulfán Sulfato	5,9598	6,0887	9,3078	99,4	342963	3738	92
Malatión	5,6384	5,6399	9,2370	99,8	1497000	4016	373

Como se mencionó anteriormente, no es necesario que las soluciones stock tengan una concentración exacta de 100 ng/μl. La concentración de la solución de diazinón es mucho más alta, debido a que el estándar puro es líquido a temperatura ambiente y esto dificulta su manejo.

3.2.1.2.Solución madre

A partir de la solución stock se preparó la solución madre de concentración 10 ng/μl. La concentración real de cada plaguicida en la solución madre se calculó usando la ecuación A3.3. En la Tabla 3.6 se reportan las concentraciones de cada analito.

Tabla 3.6. Concentración de cada plaguicida en la solución madre empleada en la validación

MIX 10 ng/μl	Peso (g)	Cantidad de solución madre (SM) (g)	Volumen SM (μl)	Concentración SM (ng/μl)	Producto (ng)	Concentración final (ng/μl)
Vial vacío	5,9438					
Clorpirifós	6,0275	0,0837	93	431	40130	10,09
Cipermetrina	6,2127	0,1852	206	195	40253	10,12
Diazinón	6,2531	0,0404	45	865	38883	9,77
Dimetoato	6,3739	0,1208	134	305	40949	10,29
Endosulfán I	6,7568	0,3829	426	93	39783	10,32
Endosulfán II	6,7568	0,3829	426	91	38805	10,07
Endosulfán Sulfato	6,7568	0,3829	426	92	39106	10,15
Malatión	6,8550	0,0982	109	373	40742	10,24
Peso final	9,5176				Promedio	10,13
Solución final (μl)	3978					

Se obtuvo una solución madre de concentración promedio 10,13 ng/μl, lo cual representa un error relativo de 1,3%. Esto indica que la solución madre fue bien preparada y se puede emplear para preparar las soluciones de trabajo.

3.2.1.3. Soluciones de trabajo

Empleando la ecuación A3.5 se calcularon las concentraciones de las seis soluciones de trabajo. La Tabla 3.7 presenta los pesos obtenidos y las concentraciones calculadas de las seis soluciones de trabajo.

Tabla 3.7. Concentraciones de las soluciones de trabajo empleadas en la validación⁹

Concentración teórica (ng/μl)	Vial vacío, p ₀ (g)	Vial + solución madre, p ₁ (g)	Vial + solución madre + solvente, p ₂ (g)	Concentración real calculada (ng/μl)
0,02	5,9673	6,0018	9,4844	0,0199
0,05	5,9410	5,9577	9,5447	0,0472
0,10	5,9174	5,9521	9,5006	0,0983
0,50	5,9771	6,1502	9,5497	0,4919
1,00	5,9634	6,3094	9,5395	0,9825
2,00	5,9272	6,6366	9,4714	2,0325

En la Tabla 3.8 se reportan los valores de error relativo porcentual y de incertidumbre asociada a la preparación de las soluciones, calculados con las ecuaciones A6.1 y A6.2, respectivamente.

Tabla 3.8. Error porcentual e incertidumbre en la preparación de soluciones de trabajo

Concentración teórica (ng/μl)	Concentración real calculada (ng/μl)	% Error	Incertidumbre (ng/μl)
0,02	0,0199	0,3164	0,00004
0,05	0,0472	5,5724	0,00161
0,10	0,0983	1,6658	0,00096
0,50	0,4919	1,6014	0,00462
1,00	0,9825	1,7545	0,01013
2,00	2,0325	1,6224	0,01873

⁹La solución de concentración 0,02 ng/μl fue preparada a partir de la de 2 ng/μl, debido a que no se contaba con pipetas que permitieran tomar volúmenes menores a 10 μl.

Se observa que todas las soluciones presentan un porcentaje de error menor a 2%, a excepción de la solución de 0,05 ng/μl, que tiene un porcentaje de 5% aproximadamente. Sin embargo, puesto que la incertidumbre relacionada a esa solución no es importante, se decidió emplear esta solución para la validación del método cromatográfico.

3.2.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Se inyectaron las seis soluciones de trabajo en el equipo por triplicado durante cinco días consecutivos usando el método BROCOLISIMDEFINITIVO, obteniéndose los resultados presentados en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Resultados de la validación del método cromatográfico

Conc. teórica (ng/μl)	Rep.	DÍA 1		DÍA 2		DÍA 3		DÍA 4		DÍA 5	
		Respuesta	Promedio	Respuesta	Promedio	Respuesta	Promedio	Respuesta	Promedio	Respuesta	Promedio
0,02	1	17880	17458	17492	17259	17122	17145	17473	16957	16648	16815
	2	16963		16832		17507		16518		17034	
	3	17531		17454		16805		16879		16763	
0,05	1	39716	38949	38207	41167	48109	47627	38931	38138	50143	49589
	2	39673		37730		47638		36138		48867	
	3	37458		47564		47135		39345		49758	
0,10	1	83822	91735	89779	89813	86487	85578	100523	96164	89672	89661
	2	98376		88528		85686		91578		89660	
	3	93006		91131		84561		96391		89652	
0,50	1	428632	426845	403750	397554	398404	385684	431415	413290	394128	394729
	2	430042		386419		378508		402944		395173	
	3	421862		402494		380141		405512		394886	
1,00	1	821296	807610	808703	787233	752025	739678	827118	794123	776216	752509
	2	806743		789416		748386		769523		730853	
	3	794792		763581		718624		785728		750457	
2,00	1	1643719	1622909	1586485	1558631	1529454	1502142	1639550	1618853	1542308	1517057
	2	1645375		1526677		1484747		1569400		1481260	
	3	1579632		1562732		1492225		1647609		1527604	

En la Tabla 3.9 se observa que la dispersión de datos en un mismo día no es significativa. Sin embargo, hay cierto nivel de dispersión en los datos de un mismo nivel obtenidos en diferentes días. Por ejemplo para la concentración de 0,05 ng/ μ l, los datos de respuesta van desde 38138 hasta 49589, es decir una diferencia de más de 11000. No obstante se debe determinar si esta dispersión es significativa, realizando un análisis de la precisión. Este análisis se presenta más adelante.

Con los resultados obtenidos de la validación del método cromatográfico se determinaron los siguientes parámetros: función de respuesta instrumental y linealidad, precisión, incertidumbre de la medición, límites de detección y cuantificación y selectividad y especificidad.

- Función de respuesta instrumental y linealidad

Para determinar la función de respuesta instrumental se elaboró una curva de calibración ajustada, para lo cual se calculó para cada nivel la media de los promedios diarios obtenidos en la Tabla 3.9. En la Tabla 3.10 se pueden observar los datos para construir la curva de calibración y en la Figura 3.4, la curva de calibración ajustada del dimetoato.

Tabla 3.10. Datos de la curva de calibración del dimetoato obtenidos en la validación

x (ng/μl)	y (respuesta)
0,02	17127
0,05	43094
0,10	90590
0,50	403621
1,00	776231
2,00	1563918

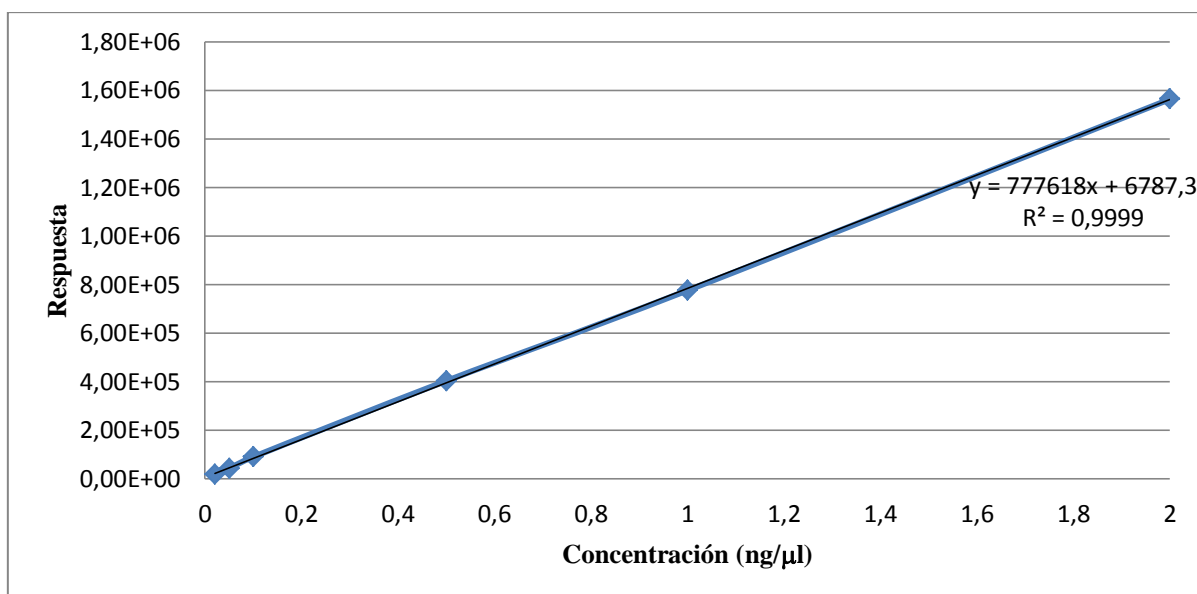


Figura 3.4. Curva de calibración ajustada del dimetoato obtenida en la validación

De esta manera, la ecuación de la curva de calibración del dimetoato fue:

$$y = 777618x + 6787,3$$

Y el R^2 , 0,9999, lo cual indica que sí existe linealidad en el intervalo de trabajo de la curva de calibración.

Una vez definida la ecuación de la curva, se calculó la incertidumbre de factor de respuesta (μFR), que es la fuente de incertidumbre por el uso de la curva de calibración ajustada, mediante la ecuación A6.4. Se obtuvo: $\mu FR = 0,0051 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Esto significa que, para cualquier respuesta Y obtenida, la concentración X calculada con la ecuación de la curva de calibración ajustada tendrá una incertidumbre de $0,0051 \text{ ng}/\mu\text{l}$ asociada únicamente a la respuesta del detector.

Después se determinaron los intervalos de confianza de la pendiente (b) y el intercepto (a), es decir los valores mínimos y máximos entre los cuales pueden encontrarse b y a. Para esto se emplearon las ecuaciones A6.7, A6.8, A6.9 y A6.10. Se obtuvieron los siguientes valores:

- Intervalo de confianza de la pendiente, b:

$$\text{Límite inferior} = 766173,9$$

$$\text{Límite superior} = 789061,9$$

- Intervalo de confianza del intercepto, a:

$$\text{Límite inferior} = -3930,8$$

$$\text{Límite superior} = 17505,2$$

- Precisión

Para determinar la precisión de los datos obtenidos, primero se calculó la concentración estimada de cada uno de los datos experimentales, empleando la ecuación A6.11 y los

valores b y a obtenidos para el dimetoato. Se obtuvieron los siguientes resultados, presentados en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11. Concentraciones estimadas de los valores experimentales

Concentración teórica (ng/μl)	Repetición	Concentración estimada (ng/μl)				
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
0,02	1	0,0220	0,0215	0,0210	0,0215	0,0204
	2	0,0208	0,0206	0,0215	0,0202	0,0209
	3	0,0215	0,0214	0,0206	0,0207	0,0205
0,05	1	0,0501	0,0482	0,0609	0,0491	0,0635
	2	0,0500	0,0475	0,0603	0,0455	0,0619
	3	0,0472	0,0602	0,0597	0,0496	0,0630
0,10	1	0,1069	0,1146	0,1103	0,1284	0,1144
	2	0,1257	0,1130	0,1093	0,1169	0,1144
	3	0,1187	0,1163	0,1079	0,1231	0,1144
0,50	1	0,5510	0,5189	0,5121	0,5546	0,5066
	2	0,5528	0,4966	0,4864	0,5179	0,5079
	3	0,5423	0,5173	0,4885	0,5212	0,5075
1,00	1	1,0567	1,0405	0,9675	1,0642	0,9987
	2	1,0380	1,0157	0,9628	0,9900	0,9402
	3	1,0226	0,9824	0,9245	1,0109	0,9655
2,00	1	2,1159	2,0422	1,9688	2,1106	1,9853
	2	2,1181	1,9652	1,9112	2,0202	1,9067
	3	2,0334	2,0116	1,9208	2,1209	1,9664

Después se calculó para cada nivel la desviación estándar de repetibilidad, S_r , y la desviación estándar de precisión intermedia, S_R , y los coeficientes de variación correspondientes. Se obtuvieron los resultados reportados en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12. Repetibilidad y precisión intermedia

Conc. Teórica (ng/μl)	Repetibilidad			Precisión intermedia		
	<i>Sr</i>	%CVR	%CVR máximo aceptado ¹⁰	<i>SR</i>	%CVR	%CVR máximo aceptado ⁸
0,02	4,80E-04	2,40	19,32	5,13E-04	2,57	28,83
0,05	2,50E-03	5,01	16,83	7,28E-03	14,57	25,12
0,10	3,64E-03	3,64	15,16	6,65E-03	6,65	22,63
0,50	1,07E-02	2,13	11,90	2,26E-02	4,51	17,76
1,00	2,75E-02	2,75	10,72	3,98E-02	3,98	16,00
2,00	4,29E-02	2,14	9,66	7,72E-02	3,86	14,41

Se observa que los coeficientes de variación de repetibilidad son menores que los de precisión intermedia, es decir que la variabilidad del método es mayor entre días que en un mismo día, lo cual se puede explicar por la variación de las condiciones de medición, como las condiciones ambientales. Adicionalmente los coeficientes de variación de repetibilidad y de precisión intermedia se encuentran muy por debajo de los valores máximos permitidos, lo cual indica que la precisión del método es adecuada y aceptable.

Finalmente se determinó la incertidumbre causada por la variabilidad del método cromatográfica (μ SR), empleando un análisis simple de varianza. Así se obtuvieron los resultados que se presentan en la Tabla 3.13.

¹⁰ Estos coeficientes se determinaron empleando las ecuaciones de Horwitz, con las ecuaciones A6.12 y A6.13.

Tabla 3.13. Incertidumbre por variabilidad

Conc. (ng/μl)	μSR (ng/μl)
0,02	5,20E-04
0,05	7,27E-03
0,10	6,44E-03
0,50	2,35E-02
1,00	4,38E-02
2,00	8,04E-02

- Estimación de la incertidumbre de la medición

Para determinar la incertidumbre de la medición, se debe identificar las diferentes fuentes de error más significativas. En ese trabajo se tomó en cuenta la incertidumbre proveniente de la preparación de las soluciones estándar (μSE), la respuesta instrumental (μFR) y la variabilidad del método cromatográfico (μSR).

La incertidumbre de la medición es por lo tanto la incertidumbre combinada de estas tres fuentes de error, obteniéndose así la siguiente ecuación:

$$U = \sqrt{\mu SE^2 + \mu FR^2 + \mu SR^2} \quad (3.1)$$

En la Tabla 3.14 se reportan las incertidumbres de las tres fuentes de error mencionadas y la incertidumbre combinada U de cada nivel de concentración. Adicionalmente se calculó la incertidumbre combinada relativa.

Tabla 3.14. Incertidumbres combinadas de cada nivel de concentración

Nivel de concentración (ng/μl)	μSE (ng/μl)	μFR (ng/μl)	μSR (ng/μl)	U (ng/μl)	U relativa (%)
0,02	0,00004	0,00511	0,00052	0,00513	25,7
0,05	0,00161	0,00511	0,00727	0,00902	18,0
0,10	0,00096	0,00511	0,00644	0,00827	8,3
0,50	0,00462	0,00511	0,02347	0,02442	4,9
1,00	0,01013	0,00511	0,04376	0,04514	4,5
2,00	0,01873	0,00511	0,08044	0,08264	4,1

Se observa claramente que la incertidumbre combinada relativa disminuye a medida que la concentración aumenta. En los niveles más bajos de concentración, la fuente de incertidumbre más significativa es el factor de respuesta; mientras que en los mayores niveles de concentración, el factor de respuesta aporta poco a la incertidumbre. Para la concentración 0,02 ng/μl se obtuvo una incertidumbre de 25%. Sin embargo, ésta no es significativa, ya que este nivel de concentración está muy por debajo del límite máximo residual del dimetoato.

- Límites de detección y cuantificación

En la Tabla 3.15 se presentan los valores obtenidos para los niveles de la curva de calibración inyectada para determinar el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC). Con estos datos se obtiene la curva de calibración de la Figura 3.5.

Tabla 3.15. Datos de la curva de calibración del dimetoato para la determinación de LD y LC

x (ng/μl)	y (respuesta)
0,02	7372
0,05	22090
0,10	72891
0,50	308773
1,00	612929
2,00	1240895

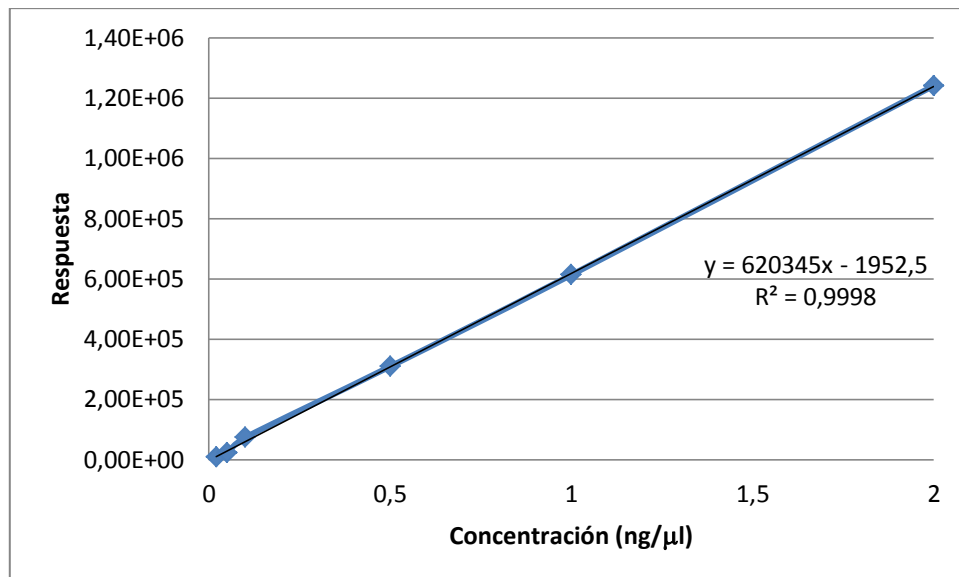


Figura 3.5: Curva de calibración del dimetoato para la determinación de LD y LC

Usando la ecuación de esta curva de calibración y las ecuaciones A6.14 y A6.15 se obtienen los resultados que constan en la Tabla 3.16.

Tabla 3.16. Límites de detección y cuantificación

Blanco	Respuesta	Concentración estimada (ng/μl)	Promedio (ng/μl)	Desviación estándar (ng/μl)	Límite de Detección (ng/μl)	Límite de Cuantificación (ng/μl)
1	327	0,0005	0,0005	0,0002	0,0007	0,002
2	409	0,0007				
3	301	0,0005				
4	325	0,0005				
5	381	0,0006				
6	296	0,0005				
7	96	0,0001				
8	301	0,0005				
9	395	0,0006				
10	395	0,0006				

Se observa que el límite de detección es bastante bajo y el límite de cuantificación está muy por debajo del límite máximo residual del dimetoato establecido por la EPA (2,0 mg/kg) y es menor que el LMR por defecto de la SANCO (0,01 mg/kg). Esto indica que con este método se pueden cuantificar cantidades de dimetoato menores que el LMR más estricto.

Sin embargo la SANCO establece que el límite de cuantificación se define como la menor concentración probada, en la cual se obtiene una recuperación promedio con una desviación estándar relativa (RSD) aceptable [34]. Como se verá más adelante, la menor concentración probada fue 0,05 mg/kg y se obtuvo una recuperación promedio adecuada con una RSD aceptable. Por lo cual se tomará para todos los plaguicidas un LC de 0,05 mg/kg.

- Selectividad y especificidad

Estos parámetros no necesitaron de validación por varias razones. Primero, porque bibliográficamente ninguno de los 8 analitos presenta interferencias significativas. Segundo, el detector empleado en este método es un espectrómetro de masas y éste proporciona una identificación prácticamente inequívoca de los compuestos analizados. Y tercero, el modo SIM reduce significativamente las interferencias, ya que registra exclusivamente iones seleccionados, característicos de cada analito.

3.2.3. VALIDACIÓN DE LA ETAPA DE TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Una vez validado el método cromatográfico, se procedió a validar el tratamiento de la muestra. Para esto se determinaron los porcentajes de recuperación y desviaciones estándar relativas para tres niveles de fortificación.

Siguiendo el procedimiento descrito en el Anexo 3 se preparó una solución madre de 10 ng/ μ l, a partir de la cual se prepararon las soluciones de trabajo para la curva de calibración. También se empleó para fortificar las muestras usadas para la validación del tratamiento de la muestra.

Las muestras fortificadas se prepararon a tres niveles de concentración:

- 0,05 mg/kg
- 0,50 mg/kg
- 1,50 mg/kg

Las muestras fortificadas fueron sometidas al proceso de extracción y limpieza y luego analizadas con el método BROCOLISIMDEFINITIVO. En la Tabla 3.17 se reportan las respuestas obtenidas para el dimetoato.

Tabla 3.17. Resultados de la validación de la etapa de tratamiento de la muestra

	Repetición	Respuesta
0,05 mg/kg	1	29907
	2	31964
	3	30164
	4	29272
	5	31810
0,50 mg/kg	1	216012
	2	249847
	3	235316
	4	229106
	5	243687
1,50 mg/kg	1	805883
	2	840252
	3	768167
	4	821703
	5	780203

Junto con las muestras, se inyectaron las seis soluciones de trabajo. A continuación en la Tabla 3.18 se presentan las respuestas obtenidas para la curva de calibración y en la Figura 3.6, el gráfico de la curva para el dimetoato.

Tabla 3.18. Datos de la curva de calibración del dimetoato obtenida para las muestras fortificadas

x (ng/μl)	y (Resp.)
0,02	2526
0,05	39319
0,10	61399
0,50	261580
1,00	499965
2,00	992354

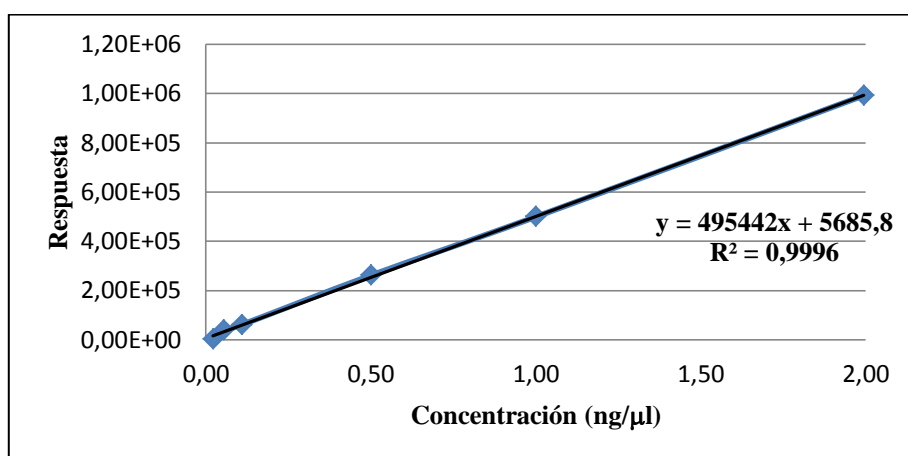


Figura 3.6. Curva de calibración del dimetoato para las muestras fortificadas

Con la ecuación de la recta de la curva de calibración se estimaron las concentraciones de cada determinación y se calculó el porcentaje de recuperación con respecto a la concentración real calculada, con la ecuación A6.16. En la Tabla 3.19 se reportan las concentraciones estimadas y los porcentajes de recuperación de los análisis para el dimetoato.

Tabla 3.19. Concentraciones estimadas y porcentajes de recuperación obtenidos para el dimetoato

	Repetición	Concentración estimada (ng/μl)	Concentración real calculada (ng/μl)	Porcentaje de recuperación (%)
0,05 mg/kg	1	0,0489	0,0428	114
	2	0,0530	0,0471	113
	3	0,0494	0,0446	111
	4	0,0476	0,0440	108
	5	0,0527	0,0538	98
0,50 mg/kg	1	0,4245	0,4579	93
	2	0,4928	0,4823	102
	3	0,4635	0,4474	104
	4	0,4510	0,4722	96
	5	0,4804	0,4622	104
1,50 mg/kg	1	1,6151	1,5334	105
	2	1,6845	1,5546	108
	3	1,5390	1,4503	106
	4	1,6470	1,5685	105
	5	1,5633	1,4501	108

Para reportar los porcentajes de recuperación, se calculó el promedio de los cinco valores y adicionalmente la desviación estándar relativa porcentual (RSD); valores que se reportan en la Tabla 3.20.

Tabla 3.20. Porcentajes de recuperación y desviaciones estándar relativas para cada nivel de fortificación

	Porcentaje de recuperación (%)	RSD (%)
0,05 mg/kg	108,74	5,92
0,50 mg/kg	99,58	5,16
1,50 mg/kg	106,52	1,40

Se considera que los porcentajes de recuperación son aceptables si están entre 70% y 120% y si tienen una desviación estándar relativa menor a 20%. Los valores para el dimetoato sí se encuentran dentro del criterio de aceptación.

3.2.4. RESUMEN DE VALIDACIÓN

Los objetivos establecidos en el Protocolo de validación (Anexo 10) fueron alcanzados, por lo cual el método se considera validado. La declaración del método validado se realizó mediante un Resumen de validación, que recoge todas las características del método, resume los parámetros determinados y presenta los criterios de aceptación y rechazo. El Resumen de validación para el dimetoato se presenta a continuación. Los resúmenes de validación de la alfa-cipermetrina, clorpirifós, diazinón, endosulfán I, endosulfán II, endosulfán sulfato y malatión se presentan en el Anexo 9.

RESUMEN DE VALIDACIÓN						
Método:	Determinación de residuos de plaguicidas en brócoli por GC-MS					
Analito:	Dimetoato					
Matriz:	Brócoli					
SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD						
Interferencias conocidas: Bibliográficamente el método no presenta interferencias para el analito a ser medido						
FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL						
Pendiente, b	776447,7544					
Intervalo de confianza de b	766174	A	789062			
Intercepto, a	815					
Intervalo de confianza de a	-3931	A	17505			
R ²	0,9997					
LÍMITES						
Límite	Valor			Unidades		
De detección	0,0007			ng/μl		
De cuantificación	0,0500			ng/μl		
PRECISION, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE						
Nivel (ng/μl)	Repetibilidad		Precisión Intermedia		Exactitud	U ng/μl
	Sr	%Cvr	SR	%CVR	error %	
0,02	4,80E-04	2,40	5,13E-04	2,57	0,31	0,0088
0,05	2,50E-03	5,01	7,28E-03	14,57	5,57	0,0114
0,10	3,64E-03	3,64	6,65E-03	6,65	1,67	0,0108
0,50	1,07E-02	2,13	2,26E-02	4,51	1,60	0,0254
1,00	2,75E-02	2,75	3,98E-02	3,98	1,75	0,0457
2,00	4,29E-02	2,14	7,72E-02	3,86	1,62	0,0830
Intervalo de trabajo validado:			0,02 ng/μl a 2 ng/μl			
PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN						
Nivel Bajo (0,05 mg/kg)			109	%	RSD (%)	5,92
Nivel Medio (0,5 mg/kg)			100	%		5,16
Nivel alto (1,5 mg/kg)			107	%		1,40
Rango de trabajo en muestra:			0,05 mg/kg a 2 mg/kg			
CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO						
Pendiente:			766174	A	789062	
Ordenada al origen:			-3931	A	17505	
Coeficiente de correlación mínimo:			0,9970			
%Cvr máximo:			Ver Tabla 1 (ecuación de Horwitz)			
%CVR máximo:			20%			
Rango de recuperación			70-120%			
%RSD máximo:			20%			
El método <i>Determinación de residuos de plaguicidas en brócoli por GC-MS</i> se declara validado para el analito <i>dimetoato</i> con las características descritas y para uso en el laboratorio por personal previamente calificado del CEAS.						
Fecha:			24/11/2011			
Responsable:			Jimena Salvador R.			

3.3.DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN MUESTRAS DE BRÓCOLI

Se determinaron los residuos de los plaguicidas en muestras de brócoli recogidas en ocho mercados en el Distrito Metropolitano de Quito. A continuación se detalla cómo se realizó la toma de muestra y cómo fueron analizadas en el laboratorio.

3.3.1. TOMA DE MUESTRAS

La toma de muestras se realizó en 8 mercados, ferias y supermercados:

- Mercado Central (Sector Centro Histórico)
- Feria de la Floresta (Sector La Floresta)
- Supermaxi (Sector La Floresta)
- Mercado Iñaquito (Sector Iñaquito)
- Santa María (Sector Iñaquito)
- Mercado de Cotocollao (Sector Cotocollao)
- Feria de la Ofelia (Sector Cotocollao)
- Feria de productos orgánicos de La Esquina (Cumbayá).

Se tomó 1 muestra por establecimiento comercial cada semana durante 4 semanas, obteniendo en total 32 muestras. Se tomaron muestras compuestas seleccionando diferentes puntos de venta del mercado o supermercado, hasta tener al menos dos kilogramos de brócoli, compuestos por al menos cinco cabezas de brócoli (como lo

establece la referencia CAC/GL 33 del Codex Alimentarius). Las 32 muestras de brócoli fueron trasladadas al laboratorio empleando una cadena de frío para su análisis.

Las muestras se codificaron de la manera más simple: tomando una o varias letras para identificar el mercado y el número de muestra (correspondiente a cada semana de muestreo). La Tabla 3.21 presenta el código para cada mercado:

Tabla 3.21. Código correspondiente a cada mercado

Mercado	Código
Central	Cx
Cotocollao	COTOx
Floresta	Fx
Iñaquito	Ix
Ofelia	Ox
Feria de productos orgánicos	ORGx
Santa María	SMx
Supermaxi	SPx

La x después de cada letra representa un número del 1 al 4, correspondiente a cada semana de muestreo.

3.3.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS

Las muestras tomadas fueron analizadas con el método BROCOLISIMDEFINITIVO, desarrollado y validado en el laboratorio. Para la preparación de las muestras se siguió el procedimiento de preparación de muestras detallado en el Anexo 5.

Cada muestra fue preparada el mismo día en que fue tomada. El extracto obtenido se colocó en un vial de dos ml, previamente pesado. Se pesó el vial con el extracto y se guardó en la congeladora hasta el día de inyección. En dicho día, el vial fue pesado nuevamente para verificar que no hubiera variación en el peso debida a evaporación del solvente.

También se prepararon una muestra fortificada (con 0,7 mg/kg) y un blanco, remplazando el brócoli por agua destilada y sometiéndolo al mismo tratamiento que al brócoli, para asegurar que no haya contaminación cruzada en ninguno de los pasos del tratamiento.

Todas las muestras de un lote¹¹ fueron inyectadas en el cromatógrafo al final de cada semana de muestreo, junto con el blanco, la muestra fortificada (spike) y el control de calidad (QC). En la Tabla 3.22 se observa el cronograma que se siguió cada semana para la preparación de muestras, del blanco y de la muestra fortificada y la inyección de los extractos.

¹¹ En este caso, el lote está compuesto de las ocho muestras tomadas en una misma semana.

Tabla 3.22. Cronograma para preparación de muestras y análisis de extractos

Semana X	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
Preparación de la muestra	COTO _x	I _x	ORG _x	C _x	O _x
		SM _x	SP _x		F _x
Preparación del blanco					BLANCO _x
Preparación de la muestra fortificada					SPIKE _x
Análisis de extractos					COTO _x , I _x , SM _x , ORG _x , SP _x , C _x , O _x , F _x BLANCO _x SPIKE _x QC

Cada semana se inyectaron los estándares correspondientes a cada uno de los seis niveles de concentración y se elaboraron las curvas de calibración de cada analito. Los extractos fueron inyectados inmediatamente después de los estándares. Entre cada extracto se inyectó acetato de etilo para limpiar la columna.

3.3.3. RESULTADOS

El software del equipo elabora un reporte de cuantificación para cada extracto. En este reporte consta la información del análisis de la muestra (archivo, fecha de adquisición, operador, nombre de la muestra, número de vial, método de cuantificación, etc.) y los resultados de la cuantificación de los compuestos analizados (nombre del compuesto, tiempo de retención, ion principal, respuesta, concentración, unidades y Q value). A continuación, en la Figura 3.7, se observa un reporte de cuantificación, correspondiente

a la muestra C4, es decir, tomada en el mercado Central en la cuarta semana. En la Figura 3.8 se observa el cromatograma correspondiente al reporte.

Quantitation Report

Data Path : D:\pesti2011\BROCOLI\DATOS\NOVIEMBRE\MUESTRAS\021211\
 Data File : C4.D
 Acq On : 2 Dec 2011 17:06
 Operator : JASR
 Sample : C4
 Misc : MUESTRA CENTRAL
 ALS Vial : 13 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Jan 30 10:19:49 2012
 Quant Method : D:\pesti2011\BROCOLI\METODOS\CURVACALMUESTRE04.H
 Quant Title : CURVA CALIBRACION 25-11-2011
 QLast Update : Mon Jan 30 10:15:58 2012
 Response via : Initial Calibration

Internal Standards	R.T.	Qion	Response	Conc	Units	Dev(Min)
Target Compounds						
						Qvalue
1) ENDOSULFAN SULFATE	15.498	272	3020	0.06	ng/ul#	36
2) DINETHOATE	12.424	87	1886	0.02	ng/ul#	48
3) DIAZINON	12.560	179	17167	0.00	ng/ul#	1
4) MALATHION	13.757	173	2958	Below Cal	#	1
5) CHLORPYRIFOS	13.841	199	9050	Below Cal	#	1
6) ENDOSULFAN I	14.549	241	14278	0.10	ng/ul#	50
7) PROFENOFOS	14.694	208	44134	Below Cal	#	47
8) ENDOSULFAN II	15.173	195	8137	0.02	ng/ul#	60
9) ALFA-CYPERMETHRIN	17.487	163	30029	Below Cal	#	47

(#) = qualifier out of range (n) = manual integration (+) = signals summed

CURVACALMUESTRE04.H Mon Jan 30 10:19:49 2012

Figura 3.7. Reporte de cuantificación

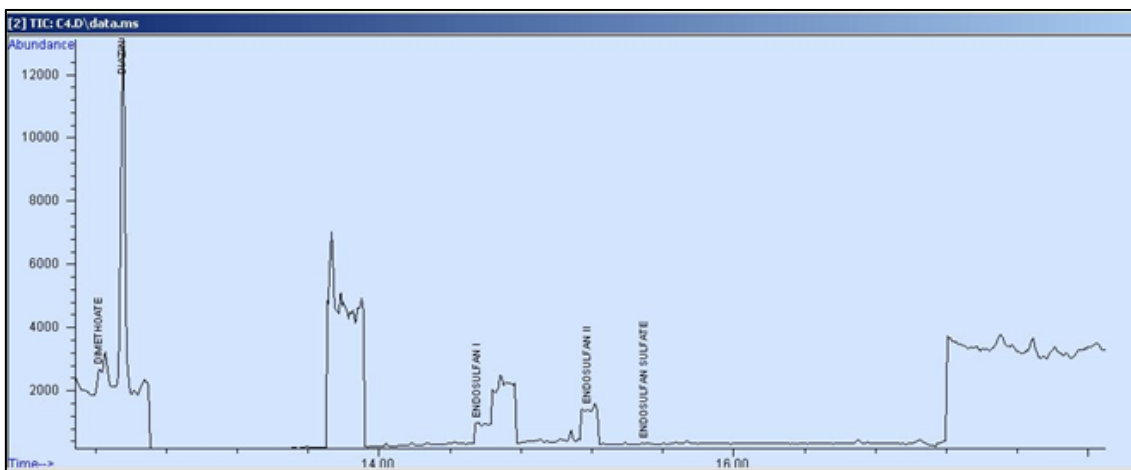


Figura 3.8. Cromatograma correspondiente al reporte

Para determinar la concentración en la muestra basta con cambiar las unidades de $\text{ng}/\mu\text{l}$ a mg/kg (ver sección 2.1.3.2). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.23.

“<LC” significa que la concentración obtenida en el reporte de cuantificación generado por el software es menor al límite de cuantificación establecido para cada analito y “N.D” se refiere a no detectado. Un compuesto se considera no detectado si en el reporte aparece como no detectado o si su Qvalue es inferior al 70% aun si se reporta una concentración mayor al límite de cuantificación. Por ejemplo, en la Figura 3.7 se observa que para el endosulfán sulfato se reporta una concentración de $0,06 \text{ ng}/\mu\text{l}$ con un Qvalue de 36 y para el endosulfán I, una concentración de $0,10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ con un Qvalue de 50. En la validación, para el endosulfán sulfato se obtuvo un Q value promedio de 72 (con valores desde 70 hasta 75) para el nivel de concentración de $0,05 \text{ ng}/\mu\text{l}$; para el endosulfán I se obtuvo para el nivel de concentración de $0,10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ un Q value promedio de 80 (con valores desde 76 hasta 83). Esto indica que cuando se trata efectivamente del analito el Q value es ser mayor que 70. Si el Q value es menor, se puede asegurar que no se trata del analito en cuestión.

Tabla 3.23. Resultados experimentales del análisis de las muestras de brócoli

	COTO				I				SM				ORG			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Dimetoato	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Diazinón	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Malatión	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Clorpirifós	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Endosulfán I	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,00 <L.C.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Endosulfán II	N.D.	N.D.	0,01 <L.C.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,02 <L.C.	N.D.	N.D.	N.D.
Endo. Sulfato	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,03 <L.C.	N.D.	N.D.	N.D.	0,02 <L.C.	N.D.
Alfa-cipermetrina	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	SP				C				O				F			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Dimetoato	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Diazinón	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Malatión	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Clorpirifós	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Endosulfán I	N.D.	N.D.	0,01 <L.C.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Endosulfán II	N.D.	0,02 <L.C.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,01 <L.C.	0,03 <L.C.	N.D.	N.D.	N.D.	0,01 <L.C.	0,02 <L.C.	N.D.
Endo. Sulfato	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Alfa-cipermetrina	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,04 <L.C.	N.D.	0,02 <L.C.

Nota: Todos los niveles no detectables (N.D.) presentados en esta Tabla corresponden al caso en que el Qvalue es menor a 70.

3.3.4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

No se encontraron residuos de dimetoato, diazinón, malatión y clorpirifós en ninguna de las muestras. En 2 muestras se detectaron residuos de endosulfán I pero en niveles bajo el límite de cuantificación (LC); en 7 muestras se encontraron niveles bajo el LC de endosulfán II; en 2 muestras se detectaron niveles bajo el LC de endosulfán sulfato y finalmente, en 2 muestras se hallaron niveles bajo el LC de alfa-cipermetrina.

Existen dos posibilidades que expliquen la ausencia de residuos de los plaguicidas organofosforados analizados en este estudio: la primera es que no todos los productores emplean estos plaguicidas en la producción de brócoli; la segunda es que los productores que sí los utilizan los emplean correctamente. En este último caso, la ausencia de residuos indicaría la degradación de los plaguicidas organofosforados.

Puesto que se encontraron residuos de endosulfán I, endosulfán II y endosulfán sulfato en algunas muestras, esto demuestra que estos plaguicidas sí son empleados por algunos productores. Lo mismo ocurre para la alfa-cipermetrina.

Puesto que todos los residuos de plaguicidas detectados se encuentran bajo el límite de cuantificación y éste, a su vez, es bastante menor que los límites máximos residuales establecidos por el Codex, se puede afirmar que la población quiteña no está expuesta al riesgo de ingerir brócoli con niveles no permitidos de cualquiera de estos siete plaguicidas.

CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Se estandarizó y validó un método para la determinación de residuos de plaguicidas en brócoli, basado en el método QuEChERS.
- El método validado opera en el rango de concentraciones de 0,02 a 2,00 mg/kg para los siguientes plaguicidas: clorpirifós, diazinón, dimetoato, malatión, endosulfán I, endosulfán II, endosulfán sulfato y alfa-cipermetrina.
- El método fue validado según los requisitos técnicos de la norma NTE ISO 17025 y cumple con los criterios de aceptación establecidos por el laboratorio.
- No se encontraron residuos de plaguicidas organofosforados en ninguna de las muestras analizadas.
- En 11 de las 32 muestras se detectaron residuos de endosulfán I, endosulfán II o endosulfán sulfato. Los residuos encontrados están en cantidades menores al límite máximo residual establecido en la norma.
- En 2 muestras se hallaron residuos de alfa-cipermetrina, pero igualmente bajo el límite máximo residual.

- Se recomienda realizar estudios sistemáticos del contenido de residuos de plaguicidas en los productos de mayor consumo de índole vegetal como frutas, verduras y hortalizas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Comunicación personal con el cMSc. Ramiro Merino, integrante del equipo investigador de la División de Toxicología Ambiental de la Comisión de Energía Atómica en 1997, Quito, 24 de Abril de 2012.
- [2] Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, (1998). *Diccionario de Ciencias Hortícolas*. Primera edición, Ed. Mundi Prensa, Madrid.
- [3] Dixon, G. (2007). *Vegetable Brassicas and Related Crucifers*. Primera edición, Cabi, Londres.
- [4] Jaramillo, J. (2002). *El poder de los vegetales: Propiedades y usos populares de las hortalizas de clima frío moderado*. Compendio 2, Centro de Investigación La Selva, Corpoica, Colombia.
- [5] University of Michigan (2010). Broccoli components limits breast cancer stem cell, U-M study finds,
<http://www2.med.umich.edu/prmc/media/newsroom/details.cfm?ID=1573>, 06 de Octubre de 2011.
- [6] United States Department of Agriculture. (2011). USDA National Nutrient Database for Standard Reference, http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl, 06 de Julio de 2011.
- [7] Le Gall, J. (2008-2009). El brócoli en Ecuador: la fiebre del oro verde. Cultivos no tradicionales, estrategias campesinas y globalización. *Anuario Americanista Europeo*, N°6-7, pp 261-288.
- [8] Centro de Información e Inteligencia Comercial. (2009). *Perfiles de producto: Perfil de brócoli*. Ecuador.
- [9] Banco Central del Ecuador. <http://www.bce.fin.ec>

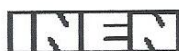
- [10] República del Ecuador. (1999-2000). *III Censo Nacional Agropecuario, Volumen I*. Ecuador.
- [11] El Comercio. (24 de Abril de 2011). Brocoleros temen por sus empleos.
- [12] Pinzón, H. (2001). *El cultivo de algunas hortalizas promisorias en Colombia*. Primera edición, Corpoica, Colombia.
- [13] Oleas, M. (2002). *Análisis de la competitividad de la cadena agroalimentaria del brócoli. Brócoli fresco/brócoli congelado*. Disertación de Economista, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador.
- [14] EPA. (s.f.). About Pesticides. <http://www.epa.gov/pesticides/about/>, 07 de Noviembre de 2011
- [15] CIVATOX. (s.f.). Aspectos generales sobre plaguicidas y su efecto sobre el hombre y el ambiente. <http://civatox.com/generalidades.pdf>, 04 de Diciembre de 2011,
- [16] Krieger, R. (2001). *Handbook of Pesticide Toxicology: Principles*. Segunda edición, Academy Press, Estados Unidos.
- [17] ATSDR. (2000). *Toxicological Profile for Endosulfan*. Atlanta, Estados Unidos.
- [18] Organización Mundial de la Salud. (1986). *Organophosphorus insecticides: A General introduction*. Ginebra, Suiza.
- [19] Fishel F., (Enero de 2002). *University of Missouri, Extension*. <http://extension.missouri.edu/publications/DisplayPub.aspx?P=G1915>, 23 de Agosto de 2011
- [20] Nollet, L. (2011). *Analysis of Endocrine Disrupting Compounds in Food*. Primera edición, Wiley-Blackwell. Ames, Estados Unidos.

- [21] Environmental Protection Agency (EPA). (Noviembre de 2011). *Pyrethroids and Pyrethrins*. <http://www.epa.gov/oppsrrd1/reevaluation/pyrethroids-pyrethrins.html>, 01 de Diciembre de 2011.
- [22] Environmental Protection Agency (EPA). (2006). *Reregistration Eligibility Decision of Cypermethrin*. Estados Unidos.
- [23] Instituto Nacional de Normalización . (2003). *Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria NTE INEN 1976:2003 Hortalizas frescas. Brócoli o brécol. Requisitos*. Quito, Ecuador.
- [24] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (s.f.). *Límites máximos del Codex para residuos de plaguicidas*. <http://www.fao.org/waicent/faostat/Pest-Residue/pest-s.htm#E10E4>, 04 de Diciembre de 2011.
- [25] Trujillo, O. (2006). *Análisis de Pesticidas por Cromatografía de Gases Un Modelo Operacional*. Primera edición, Universidad Nacional de Colombia: Sede Manizales, Colombia.
- [26] Skoog, D., Crouch, S., Holler, J. (2008). *Principios de Análisis Instrumental*. Sexta Edición, Cengage Learning, Mexico.
- [27] Gutiérrez, M. (2002). La Cromatografía de Gases y la Espectrometría de Masas: Identificación de Compuestos causantes del mal olor. *Boletín Intexter (U.P.C)*, N°122, pp 35-41.
- [28] De Hoffman, E., Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Tercera edición, Wiley, Inglaterra.
- [29] Gualotuña, M., (11-15 de Julio de 2011). *DÉCIMOPRIMER PROGRAMA DE GESTORES DE LA CALIDAD EN LOS LABORATORIOS. MÓDULO 5: Validación de métodos analíticos*. Quito.

- [30] Hirata, M. (13-14 de Mayo de 2011). *¿Por qué se debe validar un método analítico? Validación y Transferencia de Métodos Analíticos*. Lima.
- [31] CIPAC. (s.f.). Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations. *CIPAC 3807R*. Collaborative International Pesticides Analytical Council.
- [32] BIPM-JCGM. (2008). Vocabulario Internacional de Metrología: Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM). *JCGM 200:2008*.
- [33] Mol, H., Rooseboom, A., Van Dam, R., Roding, M., Arondeus, K., Sunarto, S. (2007). Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticides in produce, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, N°389, 1715-1754.
- [34] European Commission - Directorate General Health and Consumer Protection (1999). *Technical Material and Preparations: Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre- and post-registration data requirements for Annex II (part A, Section 4) and Annex III (part A, Section 5) of Directive 91/414, SANCO 3030/99 Rev.4*.

ANEXOS

ANEXO 1: NORMA NTE INEN 1976:2003



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 1 976:2003

**HORTALIZAS FRESCAS. BRÓCOLI O BRECOL.
REQUISITOS.**

Primera Edición

FRESH VEGETABLES. BROCCOLI. SPECIFICATIONS.

First Edition

DESCRIPTORES: Industria alimentaria, productos agrícolas, hortalizas frescas, brócoli, requisitos.
AL 02.01-442
CDU: 635.35
CIU: 1120
ICS: 67.080.20

Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria	HORTALIZAS FRESCAS. BROCOLI O BRECOL. REQUISITOS.	NTE INEN 1 976:2003 2003-01
<p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma establece los requisitos que debe cumplir el Brócoli o Brécol destinado para consumo en estado fresco o como materia prima para el procesamiento industrial.</p> <p style="text-align: center;">2. DEFINICIONES</p> <p>Para los efectos de esta norma se adoptan las definiciones contempladas en la NTE INEN 2104, y las que a continuación se detallan:</p> <p>2.1 Brócoli. Planta herbácea de color verde oscuro, que se cultiva para aprovechar su inflorescencia. La raíz principal es pivotante, tallo grueso y carnoso, los pedicelos se rematan terminalmente en una masa voluminosa de yemas florales hipertrofiadas muy apretadas unas contra otras de color verde claro, verde oscuro, o ligeramente púrpura de acuerdo a la variedad. Hojas festoneadas con ligeras espículas a ambos lados del nervio central y peciolo largos. La planta se caracteriza por emitir brotes laterales que forman pequeñas inflorescencias también comestibles. Su nombre científico es <i>Brassica oleracea L.</i>, pertenece a la familia de las Crucíferas, género Brassica, especie oleracea, variedad itálica.</p> <p>2.2 Inflorescencia o pella. Es la parte comestible del brócoli, constituida por agrupaciones que forman las flores al brotar con su respectivo tallo.</p> <p>2.3 Tipo de pella. Para efecto de esta norma, es el carácter dimensional de la inflorescencia que permite clasificarlo por su masa (peso).</p> <p>2.4 Pella fuera de norma. Es aquella que no cumple con los requisitos establecidos en esta norma.</p> <p>2.5 Pella fresca. Producto que, luego de la recolección, no ha sufrido cambio alguno, que afecte su maduración natural y mantiene sus cualidades.</p> <p>2.6 Tamaño de la pella. Es el carácter dimensional de las inflorescencias que permite su clasificación por tamaño.</p> <p>2.7 Masa (peso) de la pella. Es la masa de la inflorescencia, que se equilibra con el uso de pesas, en una balanza.</p> <p>2.8 Pella defectuosa. Aquella con uno o más defectos que afecten su calidad comercial.</p> <p>2.9 Bulto, gaveta, bin, caja. Volumen de algunas hortalizas que se utiliza en su comercialización.</p> <p>2.10 Atado. Porción de pellas sujetadas en sus tallos.</p> <p style="text-align: center;">3. CLASIFICACIÓN</p> <p>3.1 Tipo. La pella en función de su masa unitaria, se clasifica de acuerdo a su utilización en:</p> <p>a) Pella para la industria. La masa por unidad de tallo debe oscilar entre un 50% a 75% de la masa total de la pella.</p> <p style="text-align: right;">(Continúa)</p> <hr/> <p>DESCRIPTORES: industria alimentaria, productos agrícolas, hortalizas frescas, brócoli, requisitos.</p>		

b) Pella para consumo en fresco. La masa por unidad de tallo debe oscilar entre un 50% a 90% de la masa total de la pella.

3.1.1 Tolerancia. Se admite una tolerancia como máximo del 10% en masa.

3.2 Grado de calidad. Las pellas, de acuerdo a los grados de calidad, se clasifican en:

3.2.1 Grado I: La pella debe cumplir con los requisitos establecidos en 5.1.1, y estar exento de todo defecto que demerite la calidad del producto.

3.2.1.1 Habrá una tolerancia del 10% para las inflorescencias que no satisfagan enteramente los requisitos de este grado siempre que puedan ser clasificadas en el grado siguiente, para el consumo en fresco y para la industria de acuerdo a las normas de calidad de cada empresa.

3.2.2 Grado II: La pella debe cumplir los requisitos establecidos en 5.1.1 y se acepta lo siguiente:

a) Ligeros defectos en el color y forma y las flores abiertas de color amarillo, en pequeña proporción, siempre que no perjudiquen la apariencia general de la pella.

3.2.2.1 Se tolerará en un 12% en masa o en número para las inflorescencias de un mismo lote que no satisfagan enteramente los requisitos de este grado cuando sean considerados propios para el consumo.

3.2.2.2 Para los grados I y II se admitirá una tolerancia máxima del 15% en masa o en número que no correspondan a las características señaladas para cada grado.

3.3 Acumulación de tolerancias: En ningún caso, las tolerancias para los grados o para la masa, podrán en conjunto, exceder del 15%.

4. DISPOSICIONES GENERALES

4.1 La pella, destinada a la comercialización, debe presentarse en atados o cabezas individuales, no necesariamente de la misma variedad, pero si de calidad, forma y color uniforme.

4.2 La pella, debe ser embalada, en tal forma que se asegure una protección conveniente al producto. Papeles y otros materiales que se usen en el interior del embalaje deben ser nuevos, sin impresiones y no ser nocivos al alimento.

4.3 El proveedor debe garantizar que la muestra inspeccionada cumpla con la masa y grado declarado en el rótulo o etiqueta del envase o embalaje.

4.4 Las variedades de brócoli más difundidas en el país son: Coronado, Legacy, Marathon y Shogun.

4.4.1 El brócoli presenta los siguientes requerimientos para su mejor conservación:

- a) Temperatura 0°C, humedad relativa 95%, la vida útil va de 21 días a 28 días.
- b) Temperatura 5°C, humedad relativa 95%, la vida útil es de 14 días.
- c) Temperatura 10°C, humedad relativa 95%, la vida útil es de 5 días.

5. REQUISITOS

5.1 Requisitos específicos

5.1.1 Requisitos físicos. De acuerdo con los grados de calidad, las pellas, además de cumplir con los requisitos y tolerancias permitidos, deben tener las siguientes características:

(Continúa)

- a) Estar enteras.
- b) Estar sanas (libres de ataques de insectos y/o enfermedades, sin magulladuras, manchas oscuras, heridas, lesiones, quemaduras de sol y cicatrices, que demeriten la calidad interna del fruto).
- c) Presentar aspecto fresco y turgente con tamaño uniforme.
- d) Estar libres de humedad externa anormal producida por mal manejo en la etapa de postcosecha (recolección, acopio, selección, clasificación, adecuación, empaque, almacenamiento y transporte).
- e) Con olor, sabor y color típico de la variedad.
- f) Exento de lesiones debidas a heladas y granizo; las flores y las pellas deben estar cerradas y compactas de acuerdo a la variedad.
- g) Estar exentas de materias extrañas (restos de hojas, polvo, tierra, agroquímicos y otros) visibles en el producto o en su empaque.
- h) Con el tronco o tallo cortado de acuerdo al numeral 3.1.

5.1.2 Residuos de plaguicidas. Hasta que se expidan las normas INEN correspondientes, para los límites máximos de residuos de plaguicidas y productos afines, en alimentos, se adoptarán las recomendaciones del Codex-Alimentarius o los exigidos por el país de destino.

5.2 Requisitos complementarios

5.2.1 La comercialización de este producto debe sujetarse con lo dispuesto en la Ley de Pesas y Medidas y las Regulaciones correspondientes

6. INSPECCIÓN

6.1 Muestreo

6.1.1 El muestreo del brócoli se realizará de acuerdo con la NTE INEN 1750.

6.2 Aceptación y rechazo

6.2.1 Si la muestra inspeccionada no cumple con uno o más de los requisitos establecidos en esta norma, se repetirá la inspección en otra muestra. Cualquier resultado no satisfactorio en este segundo caso, será motivo para considerar el lote como fuera de norma.

7. MÉTODOS DE ENSAYO

7.1 Determinación del tipo o tamaño

7.1.1 La pella puede clasificarse mecánicamente, mediante el uso de una balanza para pesar en gramos o mediante una máquina clasificadora adecuada.

7.1.2 La pella debe separarse según su masa, su calidad mediante un análisis visual y registrar el número de éstos en cada grado.

(Continúa)

8. EMBALAJE

8.1 La pella debe comercializarse en cajas de madera, cartón, plástico, en carros especiales de transporte, limpios, cuidando que las inflorescencias no se deterioren, debiendo reunir condiciones de higiene, ventilación, resistencia a la humedad, manipulación, transporte, de modo que se garantice una adecuada conservación del producto.

8.2 El contenido de cada embalaje debe ser homogéneo y referirse exclusivamente a brócoli que tenga el mismo origen, variedad, tipo y con un nivel uniforme de maduración. El producto debe ser marcado con tinta inocua luego de haber sido pesados.

8.3 Las características del embalaje de madera se encuentran establecidas en la NTE INEN 1 735 y para los productos de exportación deberán satisfacer las disposiciones que exigieren los países de destino.

9. ROTULADO

9.1 Los envases deben llevar etiquetas o impresiones con caracteres legibles, en español (y en otro idioma, si las necesidades de comercialización así lo dispusieren), colocadas en tal forma que no desaparezcan por efecto de almacenamiento y transporte, debiendo contener la información mínima siguiente:

- a) Identificación del productor, exportador, emparador y/o distribuidor (marca comercial, nombre, dirección o código).
- b) Nombre y variedad del producto: BROCOLI, variedad Shogun.
- c) Características comerciales: tipo, grado, contenido neto expresado en unidades del Sistema Internacional y coloración al empacarse.
- d) País de origen y región productora.
- e) Fecha de empaque.
- f) Impresión con la simbología que indique el manejo adecuado del producto.

(Continúa)

APÉNDICE Z**Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR**

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 735:1989	<i>Embalajes de madera para frutas y hortalizas. Requisitos.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 750:1994	<i>Hortalizas y frutas frescas. Muestreo.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2 104:1996	<i>Hortalizas frescas. Definiciones y clasificación.</i>
CODEX ALIMENTARIUS:	<i>Límites máximos del Codex para residuos de plaguicidas. Suplementos 1 y 2 CAC/Vol XII Ed. 2 ó CAC/PR2 y CAC/PR3.</i>
<i>Ley de pesas y medidas, su reglamento y sus regulaciones.</i>	

Z.2 BASES DE ESTUDIO

Manual de legislación para la inspección de calidad de alimentos. Capítulo XXI. Hortalizas y verduras. (Brócoli). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Dirección General de Política Alimentaria. Madrid, España. 1986.

Codex Stan 110-1981 Norma del Codex para los brécoles congelados rápidamente. Códex alimentarius Volumen 5A. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias Organización de la Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Organización Mundial de la Salud. Roma, Italia. 1995.

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Baquerizo Moreno E8-29 y Av. 6 de Diciembre
Casilla 17-01-3999 - Telfs: (593 2)2 501885 al 2 501891 - Fax: (593 2) 2 567815
Dirección General: [E-Mail:furresta@inen.gov.ec](mailto:furresta@inen.gov.ec)
Área Técnica de Normalización: [E-Mail:normalizacion@inen.gov.ec](mailto:normalizacion@inen.gov.ec)
Área Técnica de Certificación: [E-Mail:certificacion@inen.gov.ec](mailto:certificacion@inen.gov.ec)
Área Técnica de Verificación: [E-Mail:verificacion@inen.gov.ec](mailto:verificacion@inen.gov.ec)
Área Técnica de Servicios Tecnológicos: [E-Mail:inencati@inen.gov.ec](mailto:inencati@inen.gov.ec)
Regional Guayas: [E-Mail:inenguayas@inen.gov.ec](mailto:inenguayas@inen.gov.ec)
Regional Azuay: [E-Mail:inencuenca@inen.gov.ec](mailto:inencuenca@inen.gov.ec)
Regional Chimborazo: [E-Mail:inenriobamba@inen.gov.ec](mailto:inenriobamba@inen.gov.ec)
URL: www.inen.gov.ec

**ANEXO 2: CERTIFICADOS DE ANÁLISIS DE LOS ESTÁNDARES DE
PLAGUICIDAS**

SIGMA-ALDRICH**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH D-30918 Seelze
Telefon: +49 5137 8238-150

Seelze, 24.03.2010/112323/09/15840

Order-No. :
Customer-No. :

Order-Code:

Quantity:

Production Date: 31.Aug.2009
Expiry Date: 31.Aug.2014

Article/Product: 45449

Batch : SZE9243X

Dimethoate PESTANAL®

Reference Material (RM)**1. General information**

Formula: C5H12NO3PS2
CAS-No.: [60-51-5]
Usage : Acaricide/Insecticide

Molar mass: 229.26 g/Mole
Recomm. storage temp.: 2-8 °C

The estimated uncertainty of a single measurement of the assay can be expected to be 0.5 % relative (confidence level = 95%, n= 6) whereby the assay measurements are calculated by 100% minus found impurities.

2. Batch Analysis

Identity (NMR)
Assay (HPLC)
Water (Karl Fischer)
Melting range
Date of Analysis

complying
99.6 area %
0.04 %
47.0-49.5 °C
15.Sep.2009

3. Advice and Remarks

- The minimum shelf life is based on the current knowledge and holds only for proper storage conditions in the originally closed flasks/ packages.
- Whenever the container is opened for removal of aliquot portions of the substance, the person handling the substance must assure, that the integrity of the substance is maintained and proper records of all its handlings are kept. Special care has to be taken to avoid any contamination or adulteration of the substance.
- We herewith confirm that the delivery is effected according to the technical delivery conditions agreed.
- Particular properties of the products or the suitability for a particular area of application are not assured.
- We guarantee a proper quality within our General Conditions of Sales.

Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH
Quality Management SA-LC

This document was produced electronically and is valid without a signature



660 Tower Lane • P.O. Box 599 • West Chester, PA 19381-0599
1-800-452-9994 • 1-610-692-3026 • Fax 1-610-692-8729
info@chemservice.com • www.chemservice.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

INVOICE #: CS326631
PO #: PO-12-2011

CATALOG #: F2060

CAS #: 333-41-5

DESCRIPTION: Diazinon

LOT #: 452-108A

PURITY: 99.5%

EXPIRATION DATE: 10/13

Chem Service, Inc. guarantees the purity of this chemical $\pm 0.5\%$ deviation prior to the expiration date shown on the label and exclusive of any customer contamination.

Two or more of the following methods of analysis are used to determine purity: Melting point, refractive index, titration, FTIR, IR, TLC, GC/FID, GC/TCD, GC/ECD, GC/MS, HPLC or DSC.

Our standards are suitable for use with all EPA methods.

Certified By:

John Conrad
CSM/TC



ISO 9001
Certificate Number: 31610



ISO/IEC 17025
Accreditation Number: 63520

SIGMA-ALDRICH

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH D-30918 Seelze
Telefon: +49 5137 8238-150

Seelze, 30.11.2010/150512/09/09067

Order-No.:
Customer-No.:

Order-Code:

Quantity:

Production Date: 26.May.2009
Expiry Date: 26.May.2015

Article/Product: 36143

Batch : SZB9146XV

Malathion PESTANAL®

Reference Material (RM)**1. General Information**

Formula: C10H19O6PS2
CAS-No.: [121-75-5]
Usage : Acaricide/Insecticide

Molar mass: 330.36 g/Mole
Recomm. storage temp.: 2-8 °C

The estimated uncertainty of a single measurement of the assay can be expected to be 1 % relative (confidence level = 95%, n= 6) whereby the assay measurements are calculated by 100% minus found impurities.

2. Batch Analysis

Identity (NMR)
Assay (HPLC)
Refractive index (n 25/D)
Water (Karl Fischer)
Date of Analysis

complying
97.2 area %
1.4960
0.02 %
22.Jun.2009

3. Advice and Remarks

- The minimum shelf life is based on the current knowledge and holds only for proper storage conditions in the originally closed flasks/ packages.
- Whenever the container is opened for removal of aliquot portions of the substance, the person handling the substance must assure, that the integrity of the substance is maintained and proper records of all its handlings are kept. Special care has to be taken to avoid any contamination or adulteration of the substance.
- We herewith confirm that the delivery is effected according to the technical delivery conditions agreed.
- Particular properties of the products or the suitability for a particular area of application are not assured.
- We guarantee a proper quality within our General Conditions of Sales.

Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH
Quality Management SA-LC

This document was produced electronically and is valid without a signature

SIGMA-ALDRICH

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH D-30918 Seelze
Telefon: +49 5137 8238-150

Seelze, 23.11.2010/149406/10/10953

Order-No.:
Customer-No.:

Order-Code:

Quantity:

Production Date: 21.May.2010
Expiry Date: 21.May.2015

Article/Product: 45395

Batch : SZBA141XV

Chlorpyrifos PESTANAL®

Reference Material (RM)**1. General Information**

Formula: C₉H₁₁Cl₃NO₃PS
CAS-No.: [2921-88-2]
Usage : Insecticide

Molar mass: 350.59 g/Mole
Recomm. storage temp.: 2-8 °C

The estimated uncertainty of a single measurement of the assay can be expected to be 0.5 % relative (confidence level = 95%, n= 6) whereby the assay measurements are calculated by 100% minus found impurities.

2. Batch Analysis

Identity (NMR)
Assay (HPLC)
Melting range
Water (Karl Fischer)
Date of Analysis

complying
99.9 area %
40.9-41.9 °C
0.06 %
04.Jun.2010

3. Advice and Remarks

- The minimum shelf life is based on the current knowledge and holds only for proper storage conditions in the originally closed flasks/ packages.
- Whenever the container is opened for removal of aliquot portions of the substance, the person handling the substance must assure, that the integrity of the substance is maintained and proper records of all its handlings are kept. Special care has to be taken to avoid any contamination or adulteration of the substance.
- We herewith confirm that the delivery is effected according to the technical delivery conditions agreed.
- Particular properties of the products or the suitability for a particular area of application are not assured.
- We guarantee a proper quality within our General Conditions of Sales.

Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH
Quality Management SA-LC

This document was produced electronically and is valid without a signature

Certificate of Analysis

PAGE 1 of 2

DESCRIPTION: CLP Organochlorine Pesticide Mix

CATALOG NO.: 47426-U

MPG DATE: Aug-2009

LOT NO.: LB69830

EXPIRATION DATE: Aug-2012

SOLVENT: TOLUENE:HEXANE (50:50)

ANALYTE (1)	CAS NUMBER	PERCENT PURITY (2)	WEIGHT (3)	ANALYTICAL (4)	STD DEV	SUPELCO LOT NO
			CONCENTRATION			
ALDRIN	309-00-2	98.9	2000	2060	+/- 36.6	LB45204
ALPHA-BHC	319-84-6	98.9	2001	2060	+/- 30.2	LB50488
ALPHA-CHLORDANE	5103-71-9	99.9	2001	2043	+/- 66.1	LB11073
BETA-BHC	319-85-7	99.9	2001	2202	+/- 19.2	LB54648
DELTA-BHC	319-86-8	99.5	2000	2126	+/- 32.4	LB41862
DIELDRIN	60-57-1	99.2	2000	2061	+/- 47.7	LB31702
ENDOSULFAN I (ALPHA)	959-98-8	99.9	2000	2114	+/- 29.3	LB27820
ENDOSULFAN II (BETA)	33213-65-9	99.9	2001	2062	+/- 43.4	LB54647
ENDOSULFAN SULFATE	1031-07-8	99.4	2001	2078	+/- 50.8	LB41863
ENDRIN	72-20-8	99.1	2000	2090	+/- 54.7	LB65651
ENDRIN ALDEHYDE	7421-93-4	98.4	2001	2097	+/- 42.8	LB45459
ENDRIN KETONE	53494-70-5	99.5	2000	2076	+/- 51.8	LB47822
GAMMA-BHC	58-89-9	99.9	2001	2078	+/- 18.0	LB27409
GAMMA-CHLORDANE	5103-74-2	99.9	2000	2048	+/- 45.7	LB43792
HEPTACHLOR	76-44-8	99.9	2000	2041	+/- 52.6	LB54080
HEPTACHLOR EPOXIDE ISOMER B	1024-57-3	99.9	2000	2048	+/- 42.8	LB64789
METHOXYCHLOR	72-43-5	99.9 (a)	2000	2058	+/- 61.4	LB49336
4,4'-DDD	72-54-8	98.1	2001	2072	+/- 41.9	LB34149
4,4'-DDE	72-55-9	99.2	2000	2095	+/- 41.1	LB27733

- (1) Listed in alphabetical order.
- (2) Determined by capillary GC-FID, unless otherwise noted.
 - a) HPLC UV-254NM
- (3) NIST traceable weights are used to verify balance calibration with the preparation of each lot. Concentration of analyte in solution is ug/ml +/- 0.5%, uncertainty based upon balance and Class A volumetric glassware. Weights are corrected for analytes less than 98% pure.
- (4) Determined by chromatographic analysis against an independently prepared reference lot. Mean of replicate injections.


 Elwood Doughty
 Quality Control Supervisor

Supelco warrants that its products conform to the information contained in this publication. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. Please see the latest catalog or order invoice and packing slip for additional terms and conditions of sale.



505 North Harrison Road
 Bellefonte, PA 16823-0048 USA
 Phone (814) 359-3441

SIGMA-ALDRICH**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH D-30918 Seelze
Telefon: +49 5137 8238-150

Seelze, 03.12.2010/150953/10/05073

Order-No. :
Customer-No. :

Order-Code:

Quantity:

Production Date: 09.Mar.2010
Expiry Date: 09.Mar.2015

Article/Product: 45806

Batch : SZBA068XV

alpha-Cypermethrin PESTANAL®

Reference Material (RM)**1. General Information**

Formula: C₂₂H₁₉Cl₂NO₃
CAS-No.: [67375-30-8]
Usage : Insecticide

Molar mass: 416.30 g/Mole
Recomm. storage temp.: roomtemp.

The estimated uncertainty of a single measurement of the assay can be expected to be 0.5 % relative (confidence level = 95%, n= 6) whereby the assay measurements are calculated by 100% minus found impurities.

2. Batch Analysis

Identity (NMR)
Assay (HPLC)
Melting range
Water (Karl Fischer)
Date of Analysis

	complying	
	99.7	area %
82.7-83.5		°C
	0.02	%
	30.Mar.2010	

3. Advice and Remarks

- The minimum shelf life is based on the current knowledge and holds only for proper storage conditions in the originally closed flasks/ packages.
- Whenever the container is opened for removal of aliquot portions of the substance, the person handling the substance must assure, that the integrity of the substance is maintained and proper records of all its handlings are kept. Special care has to be taken to avoid any contamination or adulteration of the substance.
- We herewith confirm that the delivery is effected according to the technical delivery conditions agreed.
- Particular properties of the products or the suitability for a particular area of application are not assured.
- We guarantee a proper quality within our General Conditions of Sales.

Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH
Quality Management SA-LC

This document was produced electronically and is valid without a signature

**ANEXO 3: PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACIÓN DE LAS
SOLUCIONES ESTÁNDAR**

1. SOLUCIÓN STOCK

1. Pesar un vial ámbar de 4 ml vacío.
2. Añadir aproximadamente 0,4 mg de estándar.
3. Pesar el vial con estándar.
4. Colocar 4 ml de acetato de etilo (EA). Pesar.
5. Agitar en Vortex durante 30 segundos. Guardar en la congeladora.
6. Medir la densidad del acetato de etilo con el densímetro.
7. Calcular la concentración real de la solución, usando la siguiente ecuación:

$$C_{stock\ real} = \frac{p_1 - p_0}{(p_2 - p_0)/d} \times 1000000 \times P \quad (A3.1)$$

Donde:

- p_0 es el peso del vial vacío, en g,
- p_1 es el peso del vial con estándar, en g,
- p_2 es el peso del vial con estándar y solvente, en g,
- d es la densidad del acetato de etilo, medida con densímetro, en g/ml,
- 1000000 el factor de conversión de g/ml a ng/ μ l, y
- P es la pureza del estándar, en %.

2. SOLUCIÓN MADRE

A partir de las soluciones stock se preparó una solución madre que contiene todos los plaguicidas en concentración 10 ng/μl, de la siguiente manera:

1. Para cada plaguicida calcular el volumen de solución stock (en μl) necesario para preparar 4 ml de solución madre de 10 ng/μl:

$$V_{stock} = \frac{C_{madre} \times V_{madre}}{C_{stock\ real}} = \frac{10 \frac{ng}{\mu l} \times 4000 \mu l}{C_{stock\ real}} \quad (A3.2)$$

2. Pesar un vial ámbar de 4 ml vacío.
3. Con las pipetas de 10-100 μl o 100-1000 μl colocar el volumen necesario de la solución stock del primer plaguicida en el vial. Tapar y pesar.
4. Añadir el volumen necesario de solución stock del segundo plaguicida en el vial. Tapar y pesar.
5. Repetir hasta tener todas las soluciones stock de los plaguicidas en el mismo vial.
6. Agregar acetato de etilo hasta tener un volumen de 4 ml. Tapar y pesar.
7. Homogenizar en el vórtex durante 30 segundos. Guardar en la congeladora.
8. Calcular la concentración real de cada plaguicida en la solución madre, usando la siguiente ecuación:

$$C_{real\ madre} = \frac{p_{n+1} - p_n}{p_f - p_0} \times C_{real\ stock} \quad (A3.3)$$

Donde:

- p_0 es el peso del vial vacío en g,
- p_{n+1} es el peso del vial después de haber añadido la solución stock, en g,
- p_n es el peso del vial antes de haber añadido la solución stock, en g,
- p_f es el peso final del vial tapado, es decir, una vez que se añadieron todas las soluciones stock y el acetato de etilo, en g, y
- $C_{real\ stock}$ es la concentración real de la solución stock, en ng/ μ l.

3. SOLUCIONES DE TRABAJO PARA CURVAS DE CALIBRACIÓN

Para preparar las soluciones de trabajo se deben seguir los siguientes pasos:

1. Calcular el volumen necesario de solución madre de 10 ng/ μ l para preparar 4 ml de solución de trabajo, usando la ecuación:

$$V_{madre} = \frac{C_{trabajo} \times V_{trabajo}}{C_{madre}} = \frac{C_{trabajo} \times 4000 \mu l}{10 \frac{ng}{\mu l}} \quad (A3.4)$$

2. Pesar un vial ámbar de 4 ml vacío.
3. Con las pipetas de 10-100 μ l y de 100-1000 μ l, colocar el volumen calculado de solución madre en el vial. Tapar y pesar.

4. Completar el volumen a 4 ml con solución matriz. Tapar y pesar.
5. Homogenizar en el vórtex durante al menos 30 segundos. Guardar en la congeladora hasta su uso.
6. Medir la densidad de la solución matriz y del acetato de etilo a temperatura ambiente con el densímetro.
7. Calcular la verdadera concentración de la solución, usando la siguiente ecuación:

$$C_{real\ trabajo} = \frac{(p_1 - p_0)/d_{madre}}{(p_2 - p_0)/d_{matriz}} \times C_{real\ madre} \quad (A3.5)$$

Donde:

- p_0 es el peso del vial tapado vacío, en g,
 - p_1 es el peso del vial tapado después de haber añadido la solución madre, en g,
 - p_2 es el peso final del vial tapado, es decir, una vez que se añadió la solución matriz, en g,
 - d_{madre} es la densidad de la solución madre, es decir, del acetato de etilo, en g/ml,
 - d_{matriz} es la densidad de la solución matriz, en g/ml, y
 - $C_{real\ madre}$ es la concentración real de la solución madre, en ng/ μ l.
8. Repetir para las otras 5 soluciones de trabajo.

2. SOLUCIÓN MATRIZ DE BRÓCOLI

La solución matriz se prepara utilizando brócoli orgánico.

1. Separar las partes comestibles del brócoli del tronco y las hojas. Descartar el tronco, picar las partes comestibles en el procesador de alimentos, hasta obtener el menor tamaño de partícula posible.
2. Pesar 100.0 g de brócoli procesado y transferir a la licuadora. Añadir 100.0 g de agua destilada.
3. Licuar durante 5 minutos en velocidad media. Transferir el licuado a un vaso de precipitación. Homogenizar bien y pesar 20.0 g de la mezcla en un tubo cónico de centrífuga de 50 ml (tubo A). Preparar 5 tubos de la misma forma.
4. En un tubo cónico de centrífuga de 50 ml (tubo B), pesar 3.750 g de $MgSO_4$, 0.625 g de PSA y 0.625 g de C_{18} .
5. Añadir 10 ml de acetato de etilo (EA), a cada uno de los 5 tubos A.
6. Transferir respectivamente el contenido del tubo 1 del DisQue CEN Dispersive SPE Kit a cada tubo A con brócoli y EA, cuidando que no queden residuos de reactivo en la rosca.
7. Tapar y agitar vigorosamente durante 1 minuto. Se pueden sostener hasta 4 tubos por mano. Al cabo de 30 segundos, ventilar el tubo para dejar salir cualquier gas causado por el calentamiento del tubo.
8. Centrifugar los tubos a 5000 rpm durante 5 min.
9. Retirar los tubos de la centrífuga y transferir el sobrenadante de cada tubo A a una probeta de 50 ml, hasta llegar a 30 ml, cuidando que no caigan pedazos de brócoli a la probeta.
10. Transferir los 30 ml al tubo B preparado anteriormente y homogenizar en el vórtex durante 1 minuto.

11. Centrifugar el tubo B a 5000 rpm durante 5 min.
12. Filtrar el sobrenadante utilizando una jeringa acoplada a un filtro Acrodisc® de 0.2 μm . Recoger el filtrado en un vial de 30 ml.

**ANEXO 4: PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE MUESTRA
PROPUESTO POR EL FABRICANTE**

DisQuE Procedure CEN Method

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

DisQuE Extraction Tube 1

Prepare Sample

Homogenize
10 g sample*
10 mL ACN**

Liquid Fractionation

Shake for 1 minute
Centrifuge 5 min > 3000 g

Collection

Remove acetonitrile for clean-up

*Depending on the matrices

**If highly acidic compounds add NaOH

DisQuE Clean-Up Tube 2

Transfer

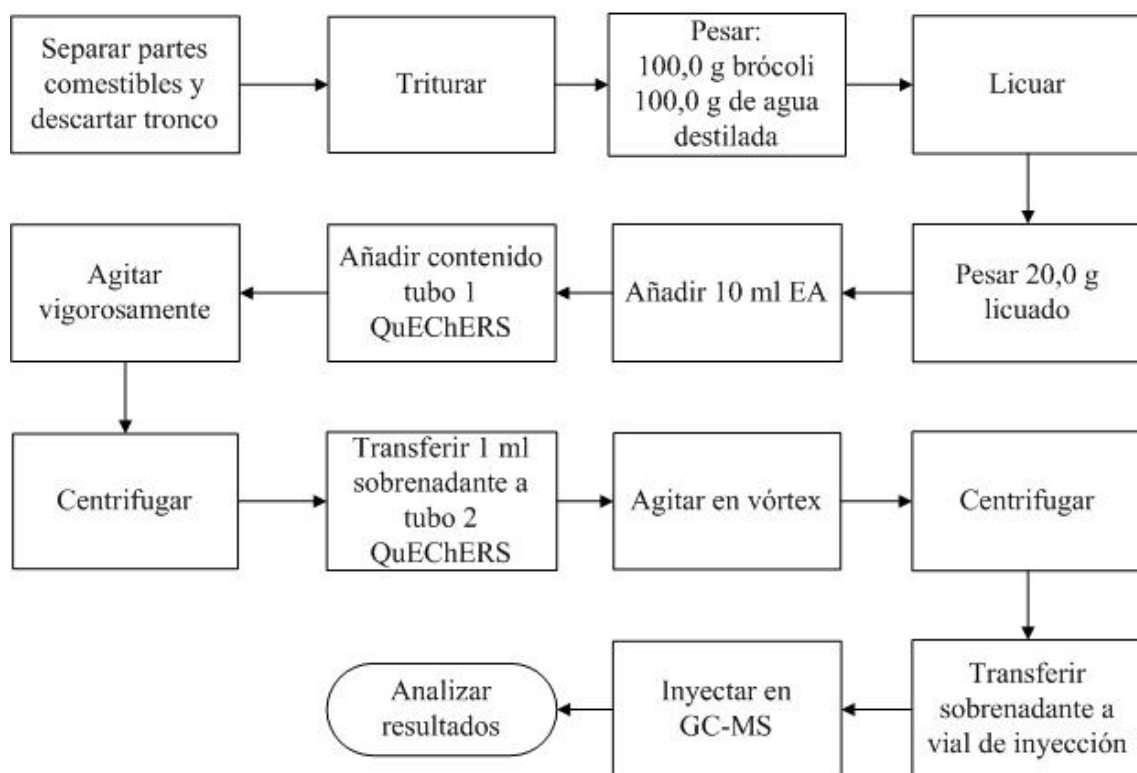
1 mL Extract
Tube 1 to Tube 2
Shake vigorously for 1 minute
Centrifuge > 1500 x g

Transfer

Collect to autosampler vial
Dilute if necessary

DISQUE[™]
Dispersive Sample Preparation

ANEXO 5: DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA



**ANEXO 6: FÓRMULAS EMPLEADAS PARA LOS CÁLCULOS NECESARIOS
EN LA VALIDACIÓN**

- **Exactitud en la preparación de soluciones**

Para determinar la exactitud en la preparación de las soluciones, se debe calcular el error relativo porcentual y adicionalmente la incertidumbre asociada a la preparación de las soluciones, usando las ecuaciones A6.1 y A6.2, respectivamente.

$$\% Error = \frac{|C_{teórica} - C_{real}|}{C_{teórica}} \times 100 \quad (A6.1)$$

$$\mu SE = \frac{|C_{teórica} - C_{real}|}{\sqrt{3}} \quad (A6.2)$$

- **Función de respuesta instrumental y linealidad**

Se calcula la desviación típica residual en la estimación de y ($S_{y,x}$) y el error en la estimación de x ($S_{x,y}$), que es la fuente de incertidumbre por el uso de la curva de calibración ajustada. A esta incertidumbre se la conoce como “incertidumbre de factor de respuesta” (μFR).

$$S_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (A6.3)$$

donde y_i es la respuesta obtenida para la concentración x_i , \hat{y}_i es el valor de y estimada para el valor de x_i y n es el número de repeticiones de un nivel de concentración.

$$\mu FR = S_{x,y} = \frac{S_{y,x}}{b} \quad (\text{A6.4})$$

Después se calcula la desviación estándar de b (S_b) y la desviación estándar de a (S_a) que permiten estimar los límites de confianza de la pendiente y el intercepto.

$$S_b = \frac{S_{y,x}}{\sqrt{\sum(x-x_{promedio})^2}} \quad (\text{A6.5})$$

$$S_a = S_b \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}} \quad (\text{A6.6})$$

Para determinar los intervalos de confianza de la pendiente y del intercepto se utilizan las siguientes ecuaciones:

- Intervalo de confianza de la pendiente, b:

$$\text{Límite inferior} = b - t \cdot S_b \quad (\text{A6.7})$$

$$\text{Límite superior} = b + t \cdot S_b \quad (\text{A6.8})$$

- Intervalo de confianza del intercepto, a:

$$\text{Límite inferior} = a - t \cdot S_a \quad (\text{A6.9})$$

$$\text{Límite superior} = a + t \cdot S_a \quad (\text{A6.10})$$

La t de student utilizada en estos cálculos ($t=2,7765$) es la correspondiente a n-2 grados de libertad (es decir 4) y una probabilidad asociada de 0,025, que equivale a un grado de confianza del 97,5%.

- **Precisión**

Se calcula la concentración estimada de cada uno de los datos experimentales, empleando la siguiente ecuación de la curva de calibración:

$$x_{estimada} = \frac{y-a}{b} \quad (A6.11)$$

Para determinar si la repetibilidad y la precisión intermedia son aceptables se utilizan las ecuaciones de Horwitz:

$$\%CVR = 2^{(1-0,5\log C)} \quad (A6.12)$$

$$\%CVR = 2^{(1-0,5\log C)} \times 0,67 \quad A6.13$$

Donde C es la concentración expresada como fracción decimal.

Se debe determinar la incertidumbre causada por la variabilidad del método (μ SR). Para esto se realiza un análisis simple de varianza (ANOVA), suponiendo k grupos muestrales (días = 5) de igual tamaño p (repeticiones = 3), siendo n el número de elementos muestrales (15).

- **Límites de detección y cuantificación**

Los límites se calculan con las fórmulas establecidas en la directriz del Codex Alimentarius CAC/GL 72-2009:

$$LD = 3,29. \sigma \quad (A6.14)$$

$$LC = 10. \sigma \quad (A6.15)$$

Donde σ es la desviación estándar de las concentraciones estimadas de cada una de las diez determinaciones.

- **Porcentajes de recuperación:**

El porcentaje de recuperación se calcula con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración Estimada}}{\text{Concentración Real}} \times 100 \quad (A6.16)$$

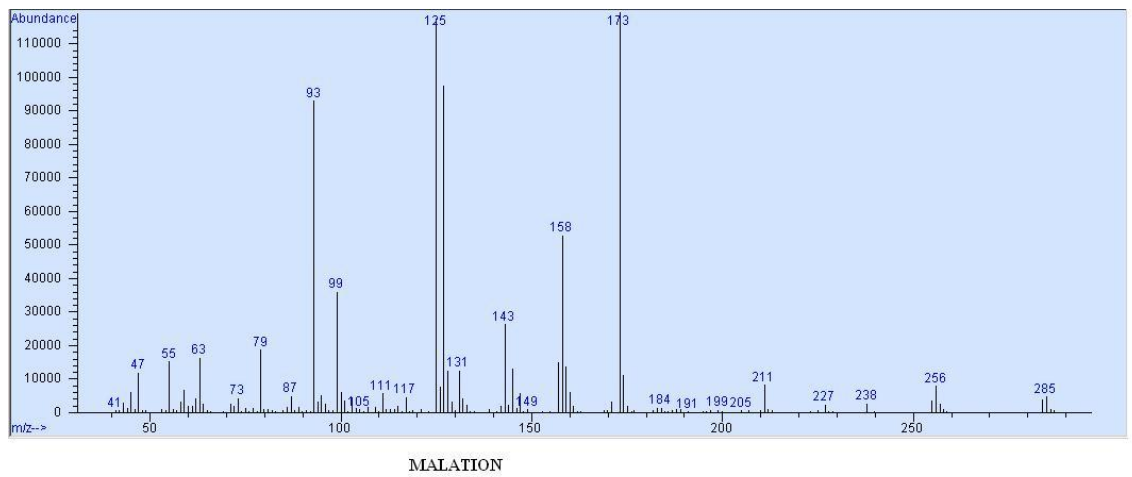
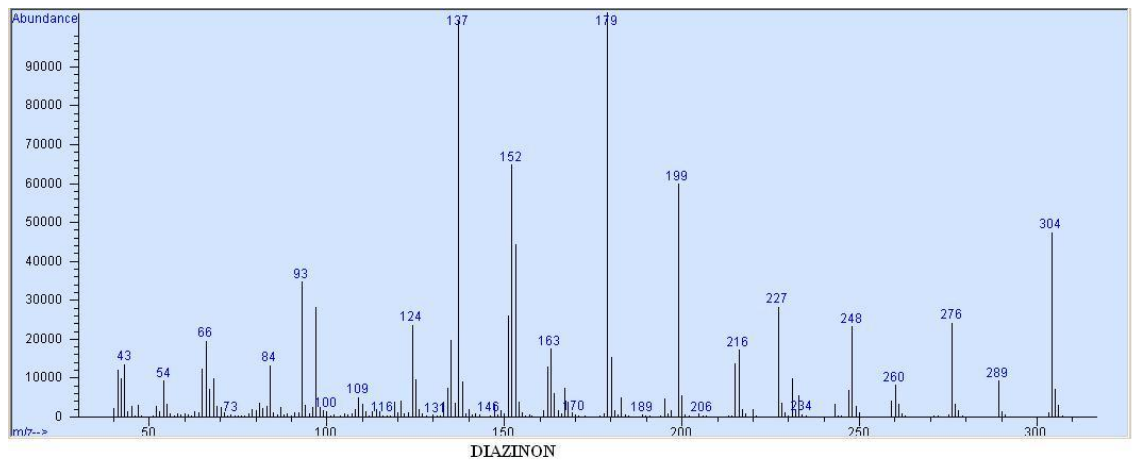
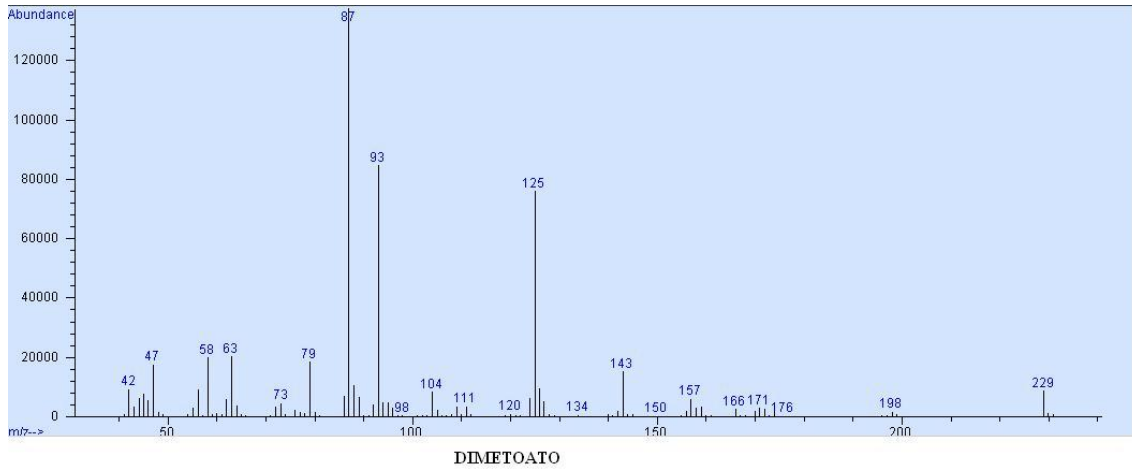
La concentración real se calcula a partir de los pesos obtenidos al momento de preparar las muestras fortificadas, utilizando esta ecuación:

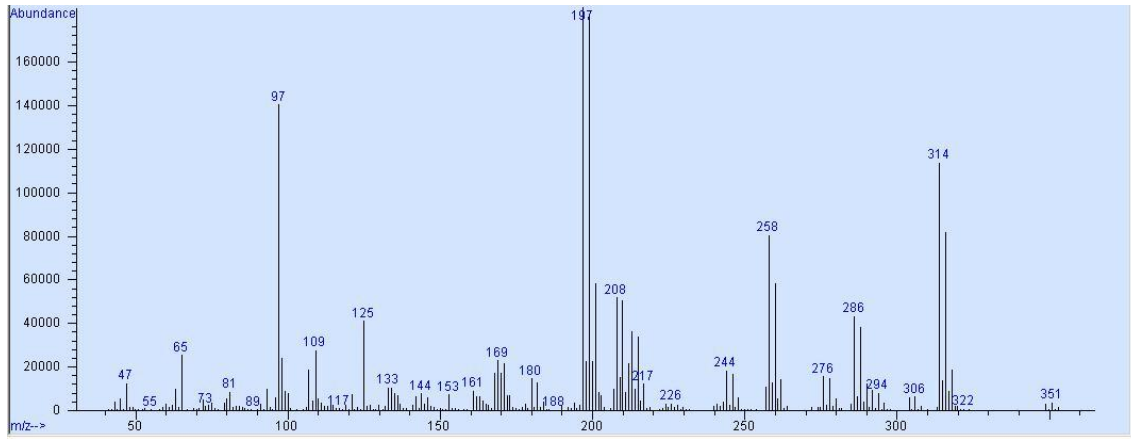
$$C_{real} = \frac{p_1 - p_0}{(p_1 - p_0) + (p_3 - p_2)} \times C_{\text{solución madre}} \quad (A6.17)$$

Donde:

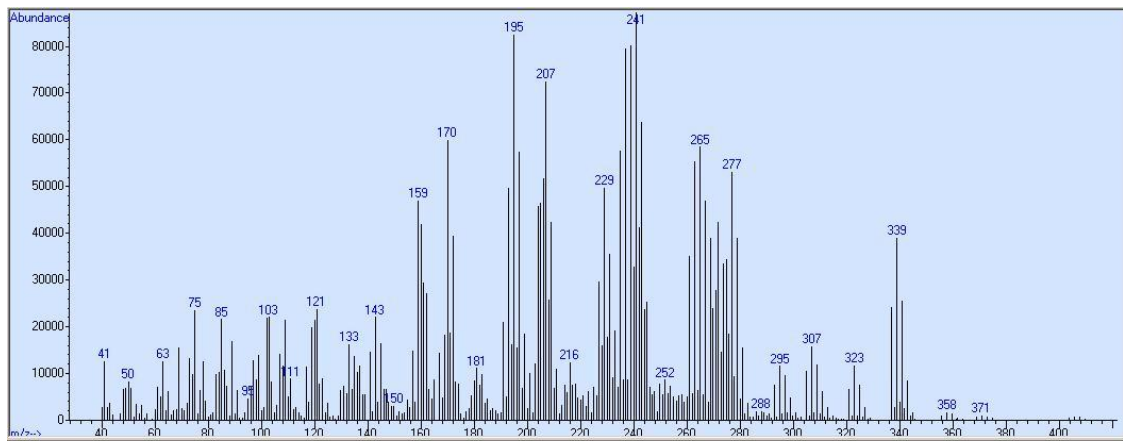
- p_0 es el peso del tubo con los 20,0 g de muestra de brócoli homogenizada,
- p_1 es el peso del tubo con la muestra tras añadir la solución de fortificación,
- p_2 es el peso del tubo con la muestra tras añadir la solución de fortificación después de los 15 minutos de espera, y
- p_3 es el peso final del tubo después de haber añadido los 10 ml de EA.

**ANEXO 7: ESPECTROS DE MASAS DE LOS OCHO ANALITOS DE INTERÉS
Y ESTRUCTURA DE LOS PRINCIPALES FRAGMENTOS**

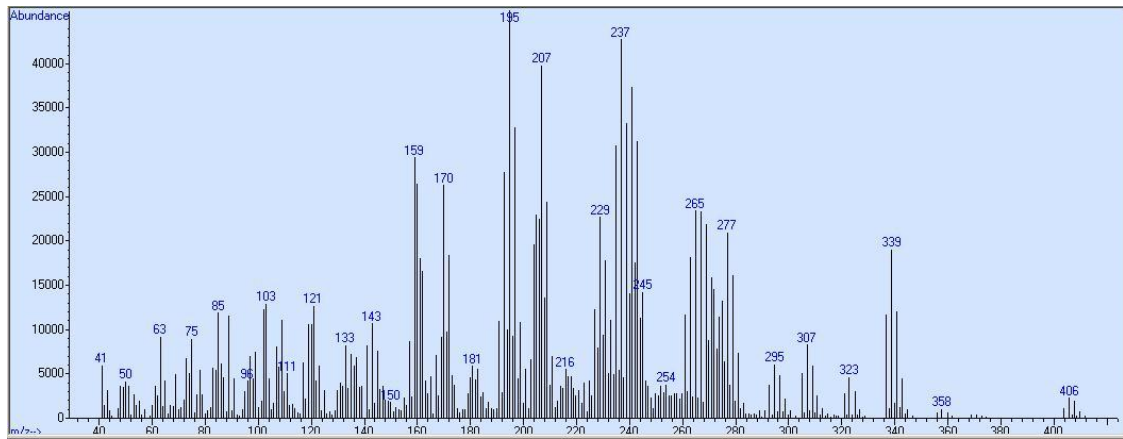




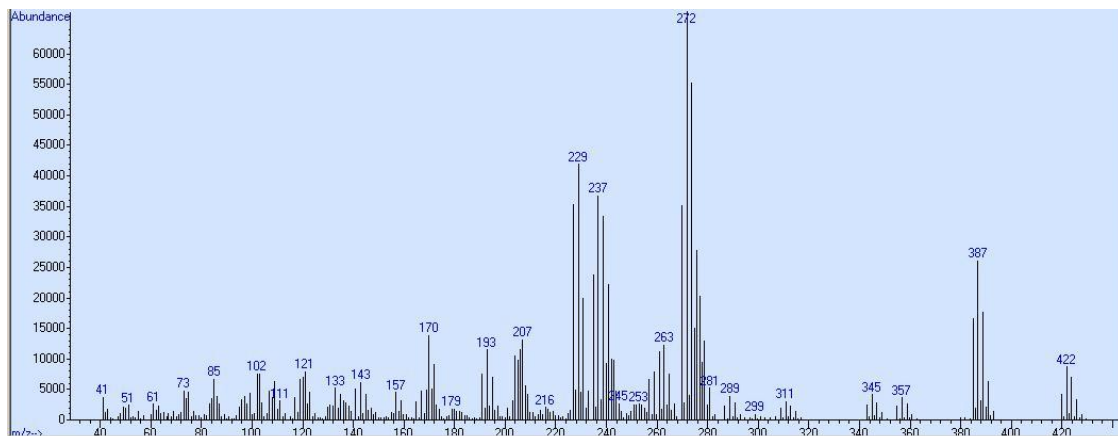
CLORPIRIFOS



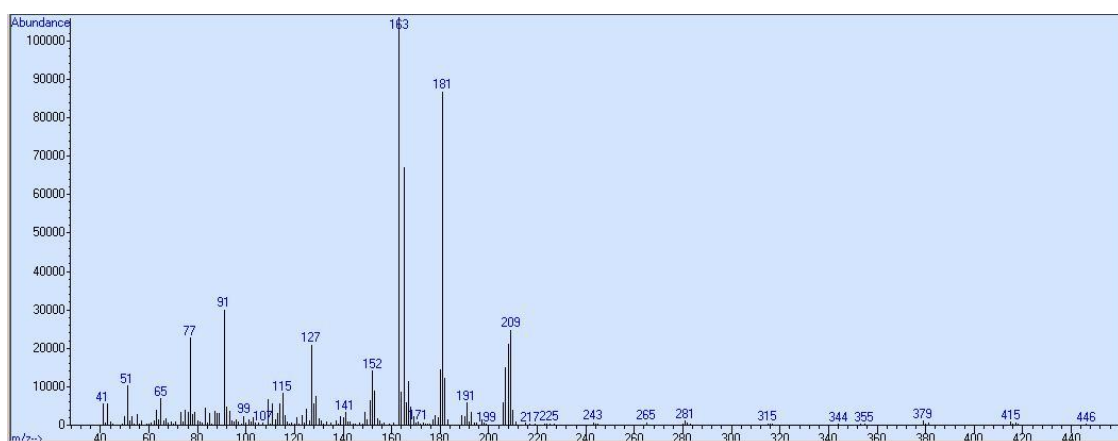
ENDOSULFAN I



ENDOSULFAN II



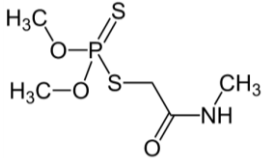
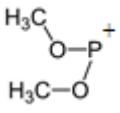
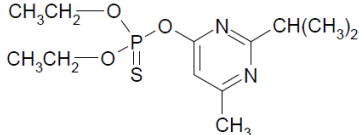
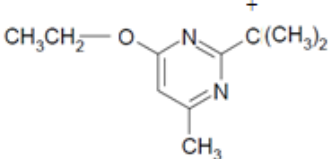
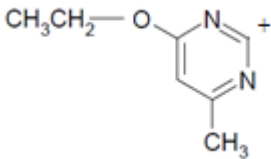
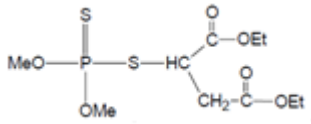
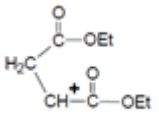
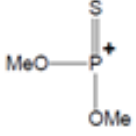
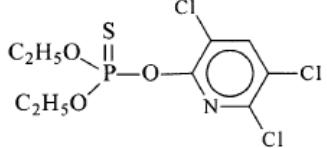
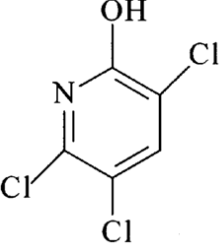
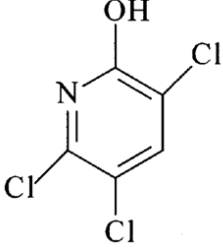
ENDOSULFAN SULFATO



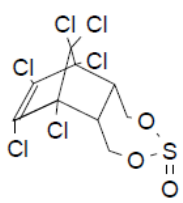
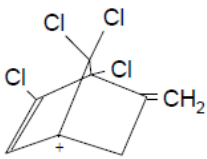
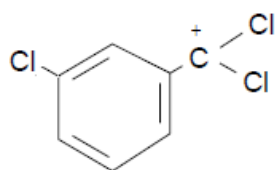
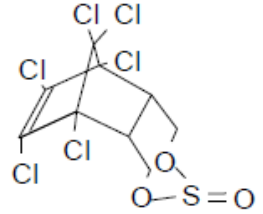
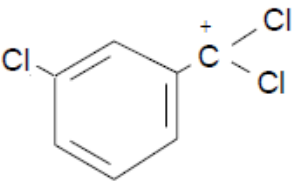
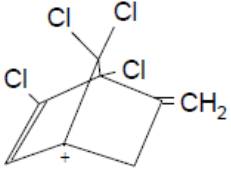
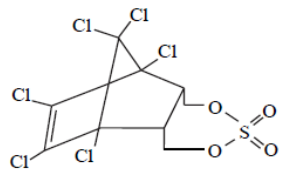
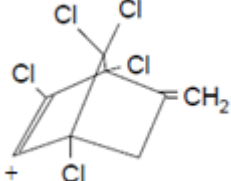
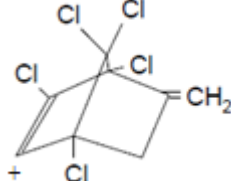
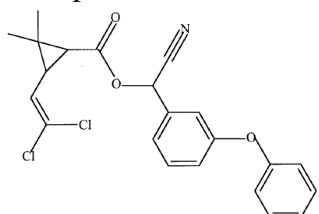
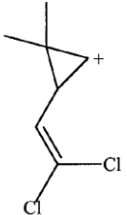
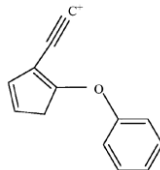
ALFA-CIPERMETRINA

A continuación en la Tabla A7.1 se presentan las estructuras de los dos fragmentos más abundantes del espectro de masas de cada analito, para entender la importancia de su abundancia. Además se indica cómo se dio la fragmentación.

Tabla A7.1. Estructuras de los fragmentos de los espectros de masas

Compuesto	Estructura del ion 1	Estructura del ion 2
<p>Dimetoato</p> 	<p>87 C₃H₅NS [1]</p>	<p>93 C₂H₆O₂P [1]</p>  <p>Estructura propuesta</p>
<p>Diazinón</p> 	<p>179</p>  <p>Migración de un grupo etoxilo unido al fósforo al oxígeno unido al grupo primidilo [2]</p>	<p>137</p>  <p>Migración de un grupo etoxilo unido al fósforo al oxígeno unido al grupo primidilo y pérdida del grupo isopropilo [2]</p>
<p>Malatión</p> 	<p>173</p>  <p>Ruptura entre el azufre y el carbono y migración de H [1]</p>	<p>125</p>  <p>Ruptura entre el fósforo y el azufre [1]</p>
<p>Clorpirifós</p> 	<p>199</p>  <p>Ruptura entre el oxígeno y el carbono y migración de H [3]</p>	<p>197</p>  <p>Ruptura entre el oxígeno y el carbono y migración de H [3]</p>

Continúa Tabla A7.1

<p>Endosulfán I</p> 	<p>241</p>  <p>Pérdida de los grupos -SO₃ , 1 -CH₂ y 2 -Cl [4]</p>	<p>195</p>  <p>Pérdida de los grupos -SO₃, 2 -CH₂ y 3 -Cl [4]</p>
<p>Endosulfán II</p> 	<p>195</p>  <p>Pérdida de los grupos -SO₃, 2 -CH₂ y 3 -Cl [4]</p>	<p>237</p>  <p>Pérdida de los grupos -SO₃ , 1 -CH₂ y 2 -Cl [4]</p>
<p>Endosulfán Sulfato</p> 	<p>272</p>  <p>Pérdida de los grupos -SO₄ , 1 -CH₂ y 1 -Cl [4]</p>	<p>274</p>  <p>Pérdida de los grupos -SO₄ , 1 -CH₂ y 1 -Cl [4]</p>
<p>Alfa-cipermetrina</p> 	<p>163</p>  <p>Ruptura entre el carbono del ciclopropano y el carbono del grupo carbonilo [5]</p>	<p>181</p>  <p>Ruptura entre el oxígeno y el carbono unido al grupo CN, pérdida del grupo CN y migración del C [5]</p>

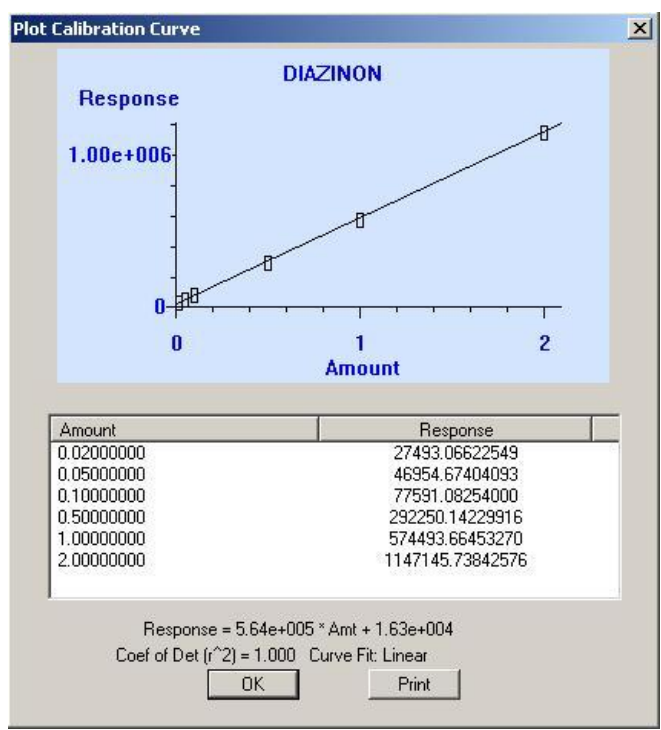
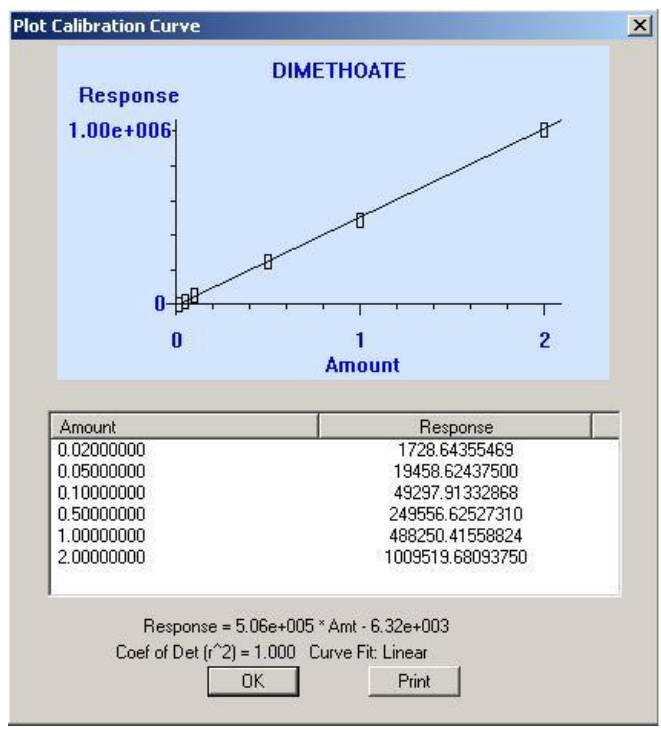
Nota: la diferencia de peso de los iones 199 y 197 del clorpirifós, 241 y 237 de los endosulfanes y 272 y

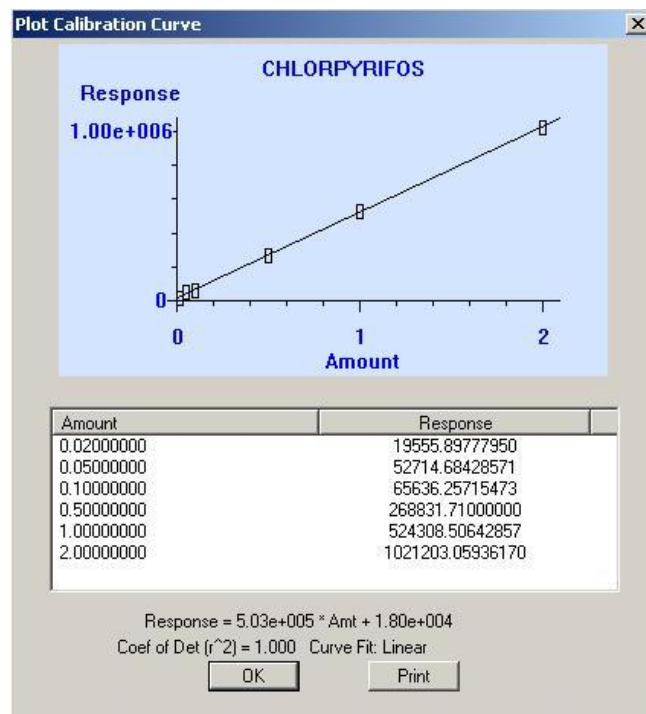
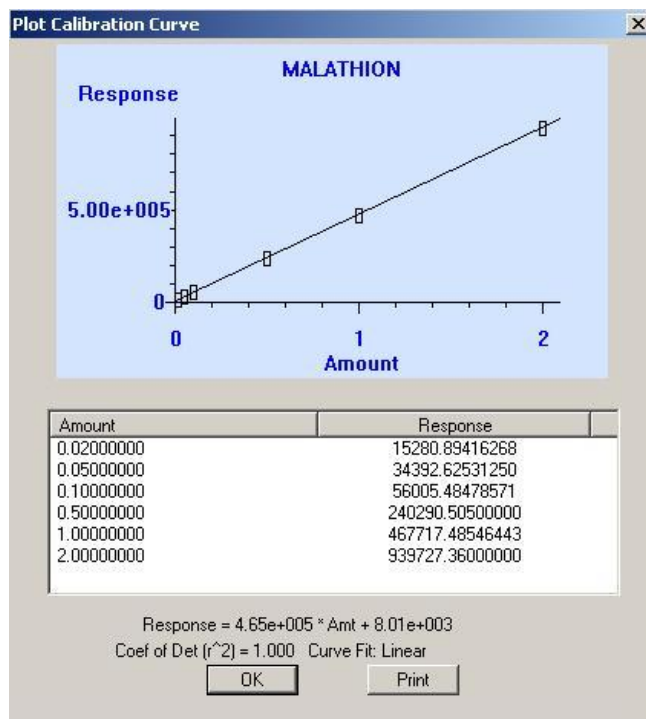
274 del endosulfán sulfato se debe a la presencia de los isótopos ³⁵Cl y ³⁷Cl.

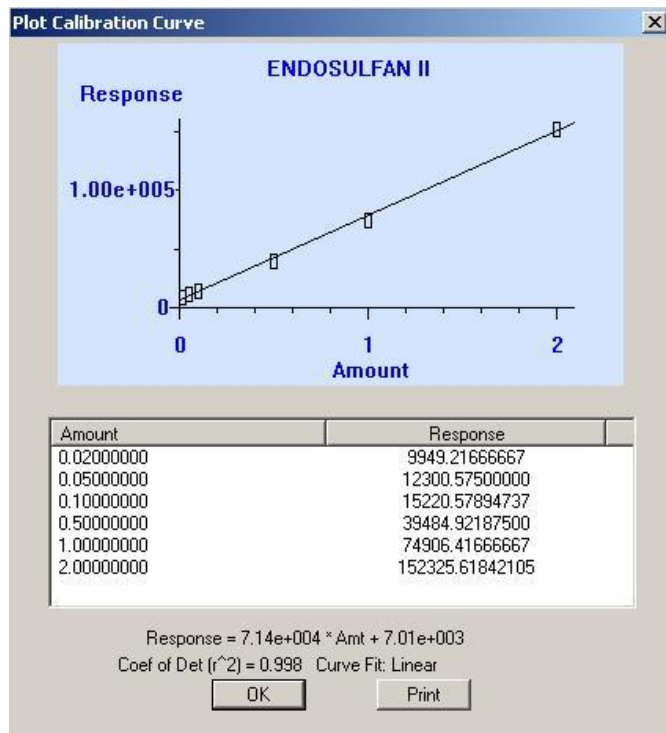
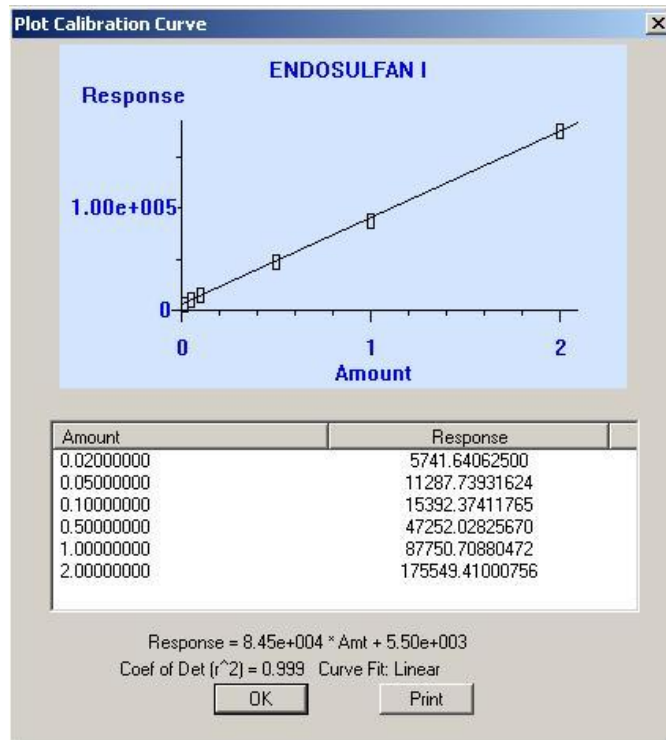
Referencias:

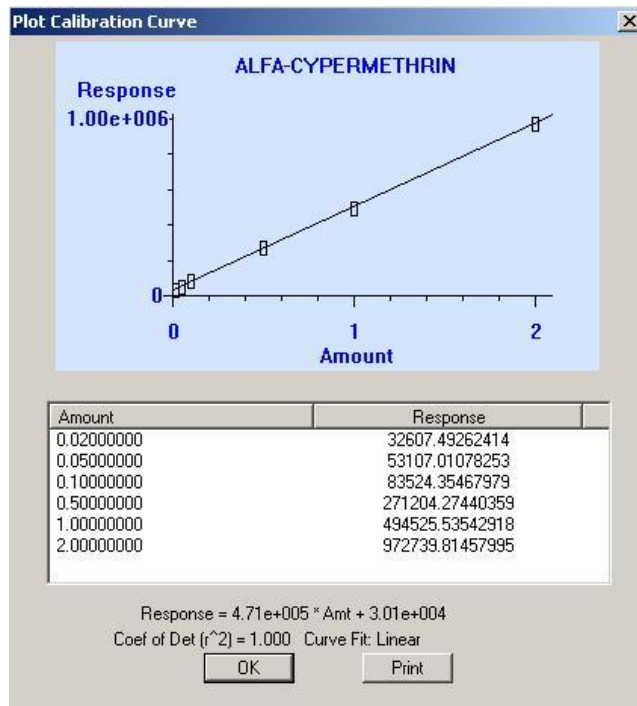
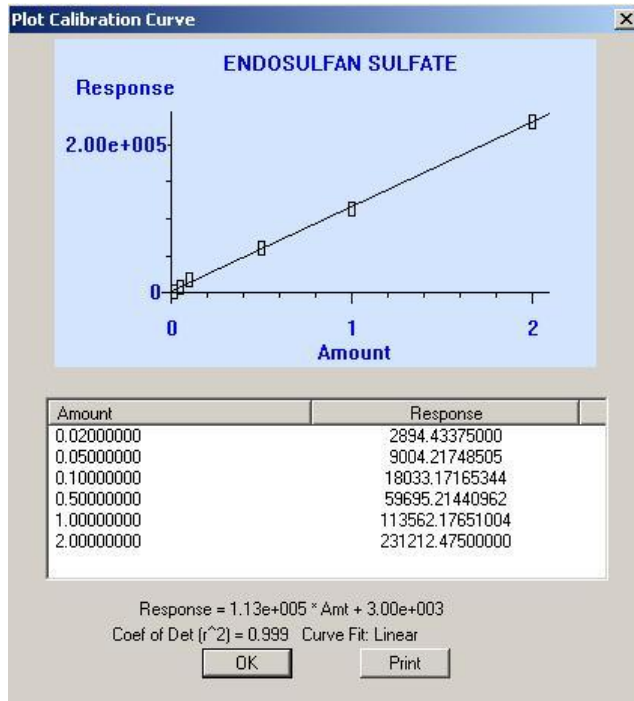
- [1] Thurman, M., Ferrer, I., Pozo, O., Sancho, J., Hernandez, F. (2007). The even-electron rule in electrospray mass spectra of pesticides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, N°21, 3855-3868.
- [2] Lopez-Avila, V., Harada, K., Masuda, K., Okomura, K., Suzuki, M., Appling, J., Moran, T., Van Der Wel, H., Nibbering, N., Kingston, E., Beynon, J. (1985). Letters to the Editor, *Journal of Mass Spectrometry*, N°8, Vol. 20, 530-537.
- [3] Hong, J., Kim, D., Paeng, K. (2000). Electron impact fragmentations of chlorinated organophosphorus pesticides, *Bulletin of the Korean Chemistry Society*, N°8, Vol. 21, 785-792
- [4] Pesticide Action Network, Information for the consideration of Endosulfan, submitted to the Stockholm Convention POPRC,
<http://chm.pops.int/Portals/0/Repository/Endosulfan2008/UNEP-POPS-POPRC-END-08-PANI.English.PDF>, 21 de Abril de 2012.
- [5] Sassine, A., Moura, S., Morais, V., Vega, O. (2004). Cypermethrin residues determination in the milk of a lactating dairy cow by gas chromatography-ion trap mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology*, Vol. 28, 238-241.

**ANEXO 8: CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS OCHO ANALITOS DE
INTERÉS**









**ANEXO 9: RESÚMENES DE VALIDACIÓN DE DIAZINÓN, MALATIÓN,
CLORPIRIFÓS, ENDOSULFÁN I, ENDOSULFÁN II, ENDOSULFÁN
SULFATO Y ALFA-CIPERMETRINA**

RESUMEN DE VALIDACIÓN						
Método:	Determinación de residuos de plaguicidas en brócoli por GC-MS					
Analito:	Diazinón					
Matriz:	Brócoli					
SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD						
Interferencias conocidas: Bibliográficamente el método no presenta interferencias para el analito a ser medido						
FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL						
Pendiente, b	557418,3195					
Intervalo de confianza de b	544469	a	570367			
Intercepto, a	8331					
Intervalo de confianza de a	-3797	a	20458			
R ²	0,9997					
LÍMITES						
Límite	Valor			Unidades		
De detección	0,0135			ng/ul		
De cuantificación	0,0500			ng/ul		
PRECISION, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE						
Nivel (ng/ul)	Repetibilidad		Precisión Intermedia		Exactitud	U ng/ul
	Sr	%CVR	SR	%CVR	error %	
0,05	5,53E-03	11,06	9,11E-03	18,22	5,51	0,012779
0,10	3,29E-03	3,29	1,73E-02	17,27	1,60	0,019193
0,50	8,64E-03	1,73	4,18E-02	8,36	1,53	0,043305
1,00	1,22E-02	1,22	6,85E-02	6,85	1,69	0,070087
2,00	3,02E-02	1,51	1,25E-01	6,25	1,69	0,127645
Intervalo de trabajo validado:		0,05 ng/ul a 2 ng/ul				
PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN						
Nivel Bajo (0,05 mg/kg)		72 %			RSD (%)	9,21
Nivel Medio (0,5 mg/kg)		73 %				7,96
Nivel alto (1,5 mg/kg)		95 %				8,20
Rango de trabajo en muestra:		0,05 mg/kg a 2 mg/kg				
CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO						
Pendiente:	544469	a	570367			
Ordenada al origen:	-3797	a	20458			
Coeficiente de correlación mínimo:	0,9970					
%CVR máximo:	Ver Tabla 1 (ecuación de Horwitz)					
%CVR máximo:	20%					
Rango de recuperación	70-120%					
% RSD	20%					
El método <i>Determinación de residuos de plaguicidas en brócoli por GC-MS</i> se declara validado para el analito <i>diazinón</i> con las características descritas y para uso en el laboratorio por personal previamente calificado del CEAS.						
Fecha:	24/11/2011					
Responsable:	Jimena Salvador					

RESUMEN DE VALIDACIÓN						
Método:	Determinación de residuos de plaguicidas en brócoli por GC-MS					
Analito:	Malatión					
Matriz:	Brócoli					
SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD						
Interferencias conocidas: Bibliográficamente el método no presenta interferencias para el analito a ser medido						
FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL						
Pendiente, b	492553,1926					
Intervalo de confianza de b	481531	a	503575			
Intercepto, a	8001					
Intervalo de confianza de a	-2322	a	18324			
R ²	0,9997					
LÍMITES						
Límite	Valor					Unidades
De detección	0,0452					ng/ul
De cuantificación	0,0500					ng/ul
PRECISION, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE						
Nivel (ng/ul)	Repetibilidad		Precisión Intermedia		Exactitud	U ng/ul
	Sr	%CVR	SR	%CVR	error %	
0,05	2,56E-03	5,12	3,62E-03	7,24	8,91	0,009087
0,10	2,92E-03	2,92	5,40E-03	5,40	5,67	0,010301
0,50	7,06E-03	1,41	2,30E-02	4,59	5,61	0,029261
1,00	1,60E-02	1,60	4,01E-02	4,01	5,75	0,053925
2,00	2,64E-02	1,32	9,25E-02	4,62	2,51	0,098197
Intervalo de trabajo validado:			0,05 ng/ul a 2 ng/ul			
PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN						
Nivel Bajo (0,05 mg/kg)			112 %		RSD (%)	4,47
Nivel Medio (0,5 mg/kg)			82 %			5,84
Nivel alto (1,5 mg/kg)			97 %			7,64
Rango de trabajo en muestra:			0,05 mg/kg a 2 mg/kg			
CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO						
Pendiente:	481531	a	503575			
Ordenada al origen:	-2322	a	18324			
Coefficiente de correlación mínimo:	0,9970					
%CVR máximo:	Ver Tabla 1 (ecuación de Horwitz)					
%CVR máximo:	20%					
Rango de recuperación	70-120%					
%RSD	20%					
El método <i>Determinación de residuos de plaguicidas en brócoli por GC-MS</i> se declara validado para el analito <i>malatión</i> con las características descritas y para uso en el laboratorio por personal previamente calificado del CEAS.						
Fecha:	24/11/2011					
Responsable:	Jimena Salvador					

RESUMEN DE VALIDACIÓN						
Método:	Determinación de residuos de plaguicidas en brócoli por GC-MS					
Analito:	Clorpirifós					
Matriz:	Brócoli					
SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD						
Interferencias conocidas: Bibliográficamente el método no presenta interferencias para el analito a ser medido						
FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL						
Pendiente, b	575521,2941					
Intervalo de confianza de b	566904	a	584138			
Intercepto, a	8928					
Intervalo de confianza de a	858	a	16999			
R ²	0,9999					
LÍMITES						
Límite	Valor				Unidades	
De detección	0,0110				ng/ul	
De cuantificación	0,0500				ng/ul	
PRECISION, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE						
Nivel (ng/ul)	Repetibilidad		Precisión Intermedia		Exactitud	U ng/ul
	Sr	%CVR	SR	%CVR	error %	
0,05	1,52E-03	3,03	3,53E-03	7,05	6,97	0,010229
0,10	1,35E-03	1,35	7,02E-03	7,02	3,66	0,011924
0,50	8,37E-03	1,67	2,91E-02	5,82	3,59	0,032281
1,00	1,97E-02	1,97	5,28E-02	5,28	3,74	0,059948
2,00	3,46E-02	1,73	1,03E-01	5,13	0,43	0,104615
Intervalo de trabajo validado:			0,05 ng/ul a 2 ng/ul			
PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN						
Nivel Bajo (0,05 mg/kg)		78 %			RSD (%)	6,36
Nivel Medio (0,5 mg/kg)		77 %				7,22
Nivel alto (1,5 mg/kg)		106 %				6,11
Rango de trabajo en muestra:			0,05 mg/kg a 2 mg/kg			
CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO						
Pendiente:	566904	a	584138			
Ordenada al origen:	858	a	16999			
Coeficiente de correlación mínimo:	0,9970					
%CVR máximo:	Ver Tabla 1 (ecuación de Horwitz)					
%CVR máximo:	20%					
Rango de recuperación	70-120%					
%RSD	20%					
El método <i>Determinación de residuos de plaguicidas en brócoli por GC-MS</i> se declara validado para el analito <i>clorpirifós</i> con las características descritas y para uso en el laboratorio por personal previamente calificado del CEAS.						
Fecha:	24/11/2011					
Responsable:	Jimena Salvador					

RESUMEN DE VALIDACIÓN						
Método:	Determinación de residuos de plaguicidas en brócoli por GC-MS					
Analito:	Endosulfán I					
Matriz:	Brócoli					
SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD						
Interferencias conocidas: Bibliográficamente el método no presenta interferencias para el analito a ser medido						
FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL						
Pendiente, b	125261,9648					
Intervalo de confianza de b	121362	a	129162			
Intercepto, a	4300					
Intervalo de confianza de a	647	a	7952			
R ²	0,9995					
LÍMITES						
Límite	Valor					Unidades
De detección	0,0293					ng/ul
De cuantificación	0,0500					ng/ul
PRECISION, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE						
Nivel (ng/ul)	Repetibilidad		Precisión Intermedia		Exactitud	U ng/ul
	Sr	%CVR	SR	%CVR	error %	
0,05	2,85E-03	5,71	5,92E-03	11,84	2,93	0,012431
0,10	3,47E-03	3,47	8,71E-03	8,71	16,10	0,016951
0,50	1,33E-02	2,66	3,28E-02	6,56	16,18	0,058799
1,00	2,13E-02	2,13	5,59E-02	5,59	16,00	0,109293
2,00	5,03E-02	2,51	1,20E-01	6,00	19,98	0,261507
Intervalo de trabajo validado:			0,05 ng/ul a 2 ng/ul			
PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN						
Nivel Bajo (0,05 mg/kg)			71 %		RSD (%)	14,20
Nivel Medio (0,5 mg/kg)			70 %			2,26
Nivel alto (1,5 mg/kg)			88 %			5,19
Rango de trabajo en muestra:			0,05 mg/kg a 2 mg/kg			
CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO						
Pendiente:	121362	a	129162			
Ordenada al origen:	647	a	7952			
Coefficiente de correlación mínimo:	0,9970					
%CVR máximo:	Ver Tabla 1 (ecuación de Horwitz)					
%CVR máximo:	20%					
Rango de recuperación	70-120%					
%RSD	20%					
El método <i>Determinación de residuos de plaguicidas en brócoli por GC-MS</i> se declara validado para el analito <i>endosulfán I</i> con las características descritas y para uso en el laboratorio por personal previamente calificado del CEAS.						
Fecha:	24/11/2011					
Responsable:	Jimena Salvador					

RESUMEN DE VALIDACIÓN						
Método:	Determinación de residuos de plaguicidas en brócoli por GC-MS					
Analito:	Endosulfán II					
Matriz:	Brócoli					
SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD						
Interferencias conocidas: Bibliográficamente el método no presenta interferencias para el analito a ser medido						
FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL						
Pendiente, b	125678,1848					
Intervalo de confianza de b	118037	a	133320			
Intercepto, a	3015					
Intervalo de confianza de a	-4142	a	10172			
R ²	0,9981					
LÍMITES						
Límite	Valor			Unidades		
De detección	0,0194			ng/ul		
De cuantificación	0,0500			ng/ul		
PRECISION, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE						
Nivel (ng/ul)	Repetibilidad		Precisión Intermedia		Exactitud	U ng/ul
	Sr	%CVR	SR	%CVR	error %	
0,05	3,43E-03	6,85	6,64E-03	13,28	5,11	0,038786
0,10	5,05E-03	5,05	8,83E-03	8,83	13,50	0,040059
0,50	2,25E-02	4,50	3,97E-02	7,95	13,57	0,068449
1,00	4,60E-02	4,60	8,27E-02	8,27	13,39	0,125429
2,00	7,70E-02	3,85	1,33E-01	6,63	17,29	0,243417
Intervalo de trabajo validado:			0,05 ng/ul a 2 ng/ul			
PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN						
Nivel Bajo (0,05 mg/kg)		97 %			RSD (%)	11,58
Nivel Medio (0,5 mg/kg)		71 %				3,46
Nivel alto (1,5 mg/kg)		78 %				4,54
Rango de trabajo en muestra:			0,05 mg/kg a 2 mg/kg			
CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO						
Pendiente:	118037	a	133320			
Ordenada al origen:	-4142	a	10172			
Coefficiente de correlación mínimo:	0,9970					
%CVR máximo:	Ver Tabla 1 (ecuación de Horwitz)					
%CVR máximo:	20%					
Rango de recuperación	70-120%					
%RSD	20%					
El método <i>Determinación de residuos de plaguicidas en brócoli por GC-MS</i> se declara validado para el analito <i>endosulfán II</i> con las características descritas y para uso en el laboratorio por personal previamente calificado del CEAS.						
Fecha:	24/11/2011					
Responsable:	Jimena Salvador					

RESUMEN DE VALIDACIÓN						
Método:	Determinación de residuos de plaguicidas en brócoli por GC-MS					
Analito:	Endosulfán Sulfato					
Matriz:	Brócoli					
SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD						
Interferencias conocidas: Bibliográficamente el método no presenta interferencias para el analito a ser medido						
FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL						
Pendiente, b	132822,8389					
Intervalo de confianza de b	125952	a	139694			
Intercepto, a	-2398					
Intervalo de confianza de a	-11499	a	6702			
R ²	0,9955					
LÍMITES						
Límite	Valor					Unidades
De detección	0,0176					ng/ul
De cuantificación	0,0500					ng/ul
PRECISION, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE						
Nivel (ng/ul)	Repetibilidad		Precisión Intermedia		Exactitud	U ng/ul
	Sr	%Cvr	SR	%CVR	error %	
0,05	3,21E-03	6,42	6,05E-03	12,10	4,80	0,033050
0,10	8,66E-03	8,66	1,64E-02	16,40	0,52	0,036770
0,50	2,94E-02	5,88	6,71E-02	13,42	0,46	0,077995
1,00	6,56E-02	6,56	1,34E-01	13,39	0,61	0,147705
2,00	9,49E-02	4,74	2,71E-01	13,53	2,80	0,288141
Intervalo de trabajo validado:			0,05 ng/ul a 2 ng/ul			
PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN						
Nivel Bajo (0,05 mg/kg)		80 %			RSD (%)	18,87
Nivel Medio (0,5 mg/kg)		71 %				6,22
Nivel alto (1,5 mg/kg)		82 %				7,72
Rango de trabajo en muestra:			0,05 mg/kg a 2 mg/kg			
CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO						
Pendiente:	125952	a	139694			
Ordenada al origen:	-11499	a	6702			
Coeficiente de correlación mínimo:	0,9970					
%Cvr máximo:	Ver Tabla 1 (ecuación de Horwitz)					
%CVR máximo:	Ver Tabla 1 (ecuación de Horwitz)					
Rango de recuperación	60-120%					
%RSD	20%					
El método <i>Determinación de residuos de plaguicidas en brócoli por GC-MS</i> se declara validado para el analito <i>endosulfán sulfato</i> con las características descritas y para uso en el laboratorio por personal previamente calificado del CEAS.						
Fecha:	24/11/2011					
Responsable:	Jimena Salvador					

RESUMEN DE VALIDACIÓN						
Método:	Determinación de residuos de plaguicidas en brócoli por GC-MS					
Analito:	Alfa-Cipermetrina					
Matriz:	Brócoli					
SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD						
Interferencias conocidas: Bibliográficamente el método no presenta interferencias para el analito a ser medido						
FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL						
Pendiente, b	939314,9969					
Intervalo de confianza de b	882371	a	996259			
Intercepto, a	2222					
Intervalo de confianza de a	-51109	a	55553			
R ²	0,9981					
LÍMITES						
Límite	Valor			Unidades		
De detección	0,0075			ng/ul		
De cuantificación	0,0500			ng/ul		
PRECISION, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE						
Nivel (ng/ul)	Repetibilidad		Precisión Intermedia		Exactitud	U ng/ul
	Sr	%CVR	SR	%CVR	error %	
0,05	5,87E-03	11,73	6,72E-03	13,44	1,86	0,022134
0,10	5,73E-03	5,73	9,95E-03	9,95	1,63	0,023419
0,50	2,82E-02	5,64	4,32E-02	8,64	1,70	0,051720
1,00	3,23E-02	3,23	9,12E-02	9,12	1,54	0,103467
2,00	1,03E-01	5,16	2,20E-01	10,99	5,03	0,248574
Intervalo de trabajo validado:			0,05 ng/ul a 2 ng/ul			
PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN						
Nivel Bajo (0,05 mg/kg)		104 %			RSD (%)	14,37
Nivel Medio (0,5 mg/kg)		106 %				15,41
Nivel alto (1,5 mg/kg)		111 %				2,20
Rango de trabajo en muestra:			0,05 mg/kg a 2 mg/kg			
CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO						
Pendiente:	882371	a	996259			
Ordenada al origen:	-51109	a	55553			
Coeficiente de correlación mínimo:	0,9970					
%CVR máximo:	Ver Tabla 1 (ecuación de Horwitz)					
%CVR máximo:	20%					
Rango de recuperación	70-120%					
%RSD	20%					
El método <i>Determinación de residuos de plaguicidas en brócoli por GC-MS</i> se declara validado para el analito <i>alfa-cipermetrina</i> con las características descritas y para uso en el laboratorio por personal previamente calificado del CEAS.						
Fecha:	24/11/2011					
Responsable:	Jimena Salvador					

Tabla 1: Valores aceptados de CVr para cada concentración según la ecuación de Horwitz

Ecuación de Horwitz

$$RSD_r = 2^{(1-0.5 \log C)} \times 0.67$$

C (ng/μl)	C (fracción decimal)	%CVr
0,01	0,00000001	21
0,02	0,00000002	19
0,05	0,00000005	17
0,1	0,0000001	15
0,5	0,0000005	12
1	0,000001	11
2	0,000002	10

Nota: la concentración C debe ser expresada en fracción decimal

ANEXO 10: PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

Objetivo y alcance

Este protocolo especifica los requisitos generales de comportamiento que debe cumplir el método *Determinación de residuos en brócoli por GC-MS*, incluyendo las condiciones para el tratamiento de las muestras. Se validará el método exclusivamente para los dieciséis analitos mencionados, con las características descritas y para uso en el laboratorio por personal previamente calificado del *CEAS*.

La validación realizada en este trabajo se basa en el modelo propuesto por el INEN conforme a la norma ISO-IEC 17025 y en el documento SANCO/10684/2009.

Etapas de la validación y parámetros a validarse

La validación del método se dividirá en dos etapas, primero se validará el método cromatográfico para luego validar el tratamiento de la muestra.

Dentro de la validación del método cromatográfico se evaluarán los siguientes parámetros:

- Selectividad y especificidad
- Linealidad del intervalo de trabajo
- Repetibilidad
- Precisión intermedia
- Límite de detección
- Límite de cuantificación

- Incertidumbre de medición

Simultáneamente se determinará la exactitud en la preparación de los estándares utilizados para la curva de calibración.

Una vez que el método cromatográfico haya sido validado se procederá a validar el tratamiento de la muestra, en esta etapa se evaluará la exactitud, expresada como porcentaje de recuperación.

Diseño experimental

Materiales, reactivos y equipos

Materiales

- Micropipeta volumétrica de 10-100 μ l
- Micropipeta volumétrica de 100-1000 μ l
- Viales ámbar de 2 ml
- Viales ámbar de 4 ml

Reactivos y estándares

- Acetato de etilo (EA) grado pesticida (Fisher Scientific)
- Alfa-cipermetrina (pureza: 99.7%, Pestanal®)
- Clorpirifós (pureza: 99.9%, Pestanal®)
- Diazinón (pureza: 99.5%, ChemService)
- Dimetoato (pureza: 99.6, Pestanal®)

- Malatión (pureza: 97.2%, Pestanal®)
- CLP Organochlorine Pesticide Mix (pureza: >99%, Supelco)
- DisQue® CEN Dispersive SPE Kit (PURIFLUIDOS)
- Sulfato de magnesio anhidro
- Sorbente C₁₈ en polvo
- Sorbente PSA en polvo
- Agua destilada

Equipo

- Sistema: Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N con detector por espectrometría de masas 5973N
- Automuestreador 7683 series
- Vórtex (Heidolph, REAX top)
- Balanza analítica ±0,0001 g (Mettler AE240)
- Balanza analítica. ±0,1 g (Boeco)
- Licuadora (Oster)
- Procesador de alimentos (Oster)

Preparación de las soluciones estándar

Para la validación del método se utilizarán materiales de referencia puros.

A partir de cada estándar se preparará una solución stock de 100 ng/μl en acetato de etilo y, a partir de ésta, una solución madre de 10 ng/μl. La solución madre se utilizará

en la preparación de las soluciones de trabajo a seis niveles de concentración: 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 y 2.0 ng/μl.

Para evaluar la exactitud en la preparación de las soluciones estándar se determinará la concentración real de las soluciones preparadas. Para esto será necesario pesar:

- el vial vacío,
- el vial luego de agregar el estándar, y
- el vial luego de agregar el solvente.

Con estos tres datos se calculará el peso de MRC agregado y el volumen de la solución final y, por lo tanto, se podrá determinar la concentración real de la solución.

Validación del método cromatográfico

Se inyectarán las seis soluciones de trabajo preparadas por triplicado durante cinco días consecutivos, de esta forma se obtendrán dieciocho datos para cada nivel de concentración.

La curva de calibración para cada analito se obtendrá con el promedio total de las respuestas a cada uno de los seis niveles de concentración. Se calcularán los coeficientes de regresión lineal (pendiente e intercepto), el coeficiente de correlación, la desviación estándar de la pendiente e intercepto, los límites de confianza de la pendiente e intercepto, la desviación típica residual en la estimación de y , y, por último, el error en

la estimación de x , que es la fuente de incertidumbre debido al uso de la curva de calibración.

Para la estimación de la precisión se realizará un análisis simple de varianza con los datos obtenidos. Se calcularán las concentraciones estimadas de cada analito utilizando la curva de calibración ajustada y se evaluará la repetibilidad en el día y la precisión intermedia entre días para cada nivel, expresadas con desviaciones estándar y coeficientes de variación. Adicionalmente se combinarán la repetibilidad y la precisión intermedia para determinar la incertidumbre causada por la variabilidad del método cromatográfico.

Para la determinación de los límites de detección y cuantificación se inyectarán diez blancos (matriz), se calcularán el promedio de las concentraciones estimadas con la curva de calibración y su desviación estándar. Se utilizarán las formulas establecidas por el Codex Alimentarius para el cálculo de los límites.

Por último se estimará la incertidumbre de la medición de cada analito, tomando en cuenta la incertidumbre de factor de respuesta, la incertidumbre por precisión y la incertidumbre en la preparación de las soluciones estándar.

Tratamiento de la muestra

Para la estimación de la exactitud, que será expresada como porcentaje de recuperación, se prepararán soluciones fortificadas a tres niveles de concentración por quintuplicado, en un solo día. Estas soluciones serán sometidas a todo el proceso de tratamiento de la

muestra, es decir: homogenización, extracción y limpieza. Se inyectará una curva de calibración con las quince muestras fortificadas con el fin de determinar la concentración de las soluciones fortificadas luego de su tratamiento.

Se prepararán soluciones stock de 100 ng/μl de cada plaguicida, las cuales servirán para preparar una solución madre de 10 ng/μl.. Esta solución madre se preparará el día en que se realice la validación del tratamiento de la muestra y servirá tanto para fortificar las soluciones como para preparar las curvas de calibración.

Las tres concentraciones con las cuales se trabajará para las soluciones fortificadas serán 0,05 mg/kg; 0,5 mg/kg y 1,5 mg/kg.

El porcentaje de recuperación reportado será el promedio de los porcentajes de las cinco soluciones fortificadas tratadas para cada nivel.

El procedimiento para la preparación de las soluciones fortificadas es el siguiente:

1. Separar del tronco las partes comestibles del brócoli. Descartar el tronco. Tomar la mitad de las partes comestibles y picarlas en el procesador de alimentos, hasta obtener el menor tamaño de partícula posible. Transferir a una bolsa con cierre hermético, previamente etiquetada. Homogenizar.
2. Pesar 100.0 g de brócoli procesado y 100.0 g de agua destilada y transferir a la licuadora.
3. Licuar durante 5 minutos en velocidad media y transferir el licuado a un vaso de precipitación. Homogenizar bien y pesar 20.0 g de la mezcla en un tubo cónico de centrífuga de 50 ml (tubo A).

4. Añadir el volumen necesario de solución madre para tener la concentración deseada de spike y pesar.
5. Agitar en el vortex, dejar reposar durante 15 minutos.
6. Añadir 10 ml de acetato de etilo (EA), agitar y pesar.
7. Transferir el contenido del tubo 1 de 50 ml del DisQue CEN Dispersive SPE Kit al tubo A con brócoli y EA, cuidando que no queden residuos de reactivo en la rosca.
8. Tapar y agitar vigorosamente durante 1 minuto
9. Centrifugar el tubo A a 5000 rpm durante 5 min.
10. Transferir con una pipeta 1 ml del sobrenadante del tubo A al tubo 2 del DisQue CEN Dispersive SPE Kit y agitar en el vortex por 1 min.
11. Centrifugar el tubo 2 a 5000 rpm durante 5 min, transferir aproximadamente 600 μ l del sobrenadante a un vial de 2 ml ámbar para inyección.

Cronogramas de trabajo

La validación del método cromatográfico tendrá lugar del lunes 17 de octubre de 2011 al viernes 21 de octubre de 2011. El día 1 de la validación (17/10/11) se prepararán la solución stock, la solución madre y las soluciones de trabajo, que serán almacenadas en refrigeración para ser utilizadas el resto de días. Del día 1 al día 5 se realizarán tres inyecciones diarias de cada nivel de concentración.

En la semana del 24 al 28 de octubre de 2011 se realizará el análisis estadístico de los datos obtenidos en la semana anterior.

La validación del tratamiento de la muestra se realizará el viernes 28 de octubre de 2011. La solución stock se preparará el 28/10/2011 de la validación. Las muestras fortificadas se prepararán y analizarán el 28/10/2011.

El análisis de los resultados obtenidos tendrá lugar la semana siguiente, es decir, del lunes 31 de octubre al viernes 4 de noviembre de 2011.

Criterios de aceptación y rechazo

Basándose en los resultados del análisis estadístico de los datos obtenidos, de la experiencia del laboratorio y de la información bibliográfica de trabajos similares se han establecido los siguientes criterios de aceptación y rechazo:

- Coeficiente de correlación mínimo: 0.997
- Coeficiente de variación de repetibilidad máximo: de acuerdo a la ecuación de

Horwitz:

$$RSD_r = 2^{(1-0.5 \log C)} \times 0.67$$

C (ng/μl)	C (fracción decimal)	%CVr
0,02	0,00000002	19
0,05	0,00000005	17
0,1	0,0000001	15
0,5	0,0000005	12
1	0,000001	11
2	0,000002	10

Nota: la concentración C debe ser expresada en fracción decimal

- Coeficiente de variación de precisión intermedia máximo: 20%
- Porcentaje de recuperación mínimo: 70%

- Porcentaje de recuperación máximo: 120%

Adicionalmente los coeficientes de regresión lineal deberán estar dentro de los intervalos de confianza determinados para cada analito.

Declaración del método validado

Si los objetivos preestablecidos en este protocolo se alcanzan luego de la validación, entonces se declarará el método como validado. La declaración recogerá todas las características del método y se presentará en forma de un resumen de validación que contenga los parámetros determinados.

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Jimena Alegría Salvador Rodríguez, C.I. 171189149-7, autora del trabajo de graduación intitulado “Validación de un método para la determinación de residuos de plaguicidas en brócoli, *Brassica oleracea*, por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MSD)”, previa a la obtención del grado académico de Licenciada en Ciencias Químicas con mención en Química Analítica en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 26 de abril de 2012

Srta. Jimena Alegría Salvador Rodríguez

C.I. 171189149-7