

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

Determinación de residuos de metomil, carbofuran, carbarilo y profenofos en brócoli  
(*Brassica oleracea*) por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a  
espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS)

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

FRANCISCO JAVIER ITURRA MORENO

Quito, 2012

## **CERTIFICADO**

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas, con mención en Química Analítica, del candidato Francisco Javier Iturra Moreno ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Fecha:

Director de la Disertación

# DEDICATORIA

*A todos lo que hicieron posible este trabajo.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis padres por toda su paciencia y apoyo.

A todos los profesores de la Escuela de Ciencias Químicas, en especial al Licenciado Ramiro Merino que sin sus conocimientos y consejos este trabajo no podría haberse llevado a cabo. Al Ingeniero Marcelo Parreño quién sentó las bases para mi formación como analista,

A la Doctora Olga Pazmiño por su total apoyo para la realización de este trabajo, a la Ingeniera Mónica Torres y a todos los funcionarios de AGROCALIDAD por toda su apertura y colaboración. A mis amigos y compañeros María José Maldonado y Pablo Torres.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>CERTIFICADO</b> .....	<b>ii</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>iv</b>
<b>TABLA DE CONTENIDOS</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	<b>xii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO I: PARTE TEÓRICA</b> .....	<b>5</b>
1.1. El brócoli .....	<b>5</b>
1.1.1. El brócoli en Ecuador. ....	<b>6</b>
1.1.2. Plagas que afectan al brócoli .....	<b>6</b>
1.2. Los plaguicidas .....	<b>7</b>
1.2.1. Profenofos.....	<b>7</b>

1.2.2. Metomil.....	8
1.2.3. Carbofuran .....	10
1.2.4. Carbarilo .....	11
1.3. Consecuencias del uso de plaguicidas en la agricultura en Ecuador .....	12
1.4. Monitoreo y control de plaguicidas en alimentos en Ecuador.....	13
1.5. Normativa nacional e internacional.....	14
1.6. Análisis de residuos de plaguicidas .....	15
1.6.1. Preparación de la muestra .....	15
1.6.2. Cromatografía líquida.....	17
1.6.3. Espectrómetro de masas doble.....	20
1.6.3.1. Ionización por electrospray .....	21
1.6.3.2. Cuadrupolos .....	22
1.6.3.3. Celda de colisión.....	22
1.6.3.4. Detector.....	22
1.6.3.5. Modos de adquisición de datos .....	23
1.6.3.6. Ventanas de análisis y duel .....	24
1.7. Validación de métodos analíticos .....	24
<b>CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>26</b>
2.1. Materiales e instrumentación.....	26

2.1.1. Equipos .....	26
2.1.2. Materiales.....	27
2.1.3. Reactivos.....	27
2.2. Métodos .....	28
2.2.1. Estandarización del método instrumental .....	28
2.2.1.1. Calibración.....	28
2.2.1.2. Seteo de masas .....	29
2.2.1.3. Condiciones cromatográficas.....	31
2.2.2. Estandarización del método de extracción.....	33
2.2.2.1. Protocolo del método de extracción de plaguicidas.....	34
2.2.3. Validación del método .....	35
2.3. Determinación de Profenofos, Metomil, Carbofuran y Carbarilo en brócoli proveniente del Mercado Mayorista de Quito .....	42
2.3.1. Toma de muestra.....	42
2.3.2. Análisis de las muestras .....	43
<b>CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>44</b>
3.1. Validación del método.....	44
3.1.1. Cálculo de la curva de calibración.....	44
3.1.2. Límites de detección y cuantificación .....	46

3.1.3. Linealidad de la respuesta instrumental.....	47
3.1.4. Precisión.....	49
3.1.5. Estimación de la incertidumbre .....	51
3.1.6. Porcentaje de recuperación .....	52
3.2. Cualificación y cuantificación de las muestras.....	53
3.2.1. Cualificación de las muestras .....	53
3.2.2. Cuantificación de las muestras .....	56
<b>CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>60</b>
<b>CAPÍTULO V: BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>69</b>
<b>DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN .....</b>	<b>92</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> Propiedades físico-químicas del Profenofos .....	<b>8</b>
<b>Tabla 1.2.</b> Propiedades físico-químicas del Metomil .....	<b>9</b>
<b>Tabla 1.3.</b> Propiedades físico-químicas del Carbofuran .....	<b>11</b>
<b>Tabla 1.4.</b> Propiedades físico-químicas del Carbarilo .....	<b>12</b>
<b>Tabla 2.1.</b> Parámetros instrumentales del detector de masas tándem .....	<b>30</b>
<b>Tabla 2.2.</b> Condiciones específicas de operación para cada analito .....	<b>31</b>
<b>Tabla 2.3.</b> Tiempos de retención para cada analito frente a estándares .....	<b>41</b>
<b>Tabla 2.4.</b> Relación entre el ion principal y el secundario de cada analito .....	<b>41</b>
<b>Tabla 3.1.</b> Ecuaciones de la recta para cada analito .....	<b>44</b>
<b>Tabla 3.2.</b> Límites de detección y cuantificación para cada analito .....	<b>46</b>
<b>Tabla 3.3.</b> Porcentaje de residuales de la curva de calibración promedio .....	<b>47</b>
<b>Tabla 3.4.</b> Resultados del cálculo de la precisión para Metomil .....	<b>49</b>
<b>Tabla 3.5.</b> Resultados del cálculo de la precisión para Carbofuran .....	<b>50</b>
<b>Tabla 3.6.</b> Resultados del cálculo de la precisión para Carbarilo .....	<b>50</b>
<b>Tabla 3.7.</b> Resultados del cálculo de la precisión para Profenofos.....	<b>50</b>
<b>Tabla 3.8.</b> Resultados del cálculo de incertidumbre para Metomil .....	<b>51</b>
<b>Tabla 3.9.</b> Resultados del cálculo de incertidumbre para Carbofuran .....	<b>51</b>
<b>Tabla 3.10.</b> Resultados del cálculo de incertidumbre para Carbarilo .....	<b>51</b>
<b>Tabla 3.11.</b> Resultados del cálculo de incertidumbre para Profenofos .....	<b>52</b>
<b>Tabla 3.12.</b> Curvas de calibración utilizadas para el estudio de la recuperación con los errores porcentuales de los residuales .....	<b>52</b>
<b>Tabla 3.13.</b> Porcentaje de recuperación promedio .....	<b>53</b>
<b>Tabla 3.14.</b> Ecuaciones utilizadas para la cuantificación de los distintos analitos en	

las muestras .....	54
<b>Tabla 3.15.</b> Tiempos de retención de cada analito frente a estándares .....	54
<b>Tabla 3.16.</b> Relación entre el ion principal y secundario de las muestras .....	55
<b>Tabla 3.17.</b> Límites de detección y cuantificación para cada analito .....	56
<b>Tabla 3.18.</b> Resultados de los análisis de las muestras de brócoli .....	57
<b>Tabla 3.19.</b> Resumen de las legislaciones tomadas en cuenta en este trabajo .....	58
<b>Tabla 3.20.</b> Muestras que incumplen con la legislación del Ecuador .....	58
<b>Tabla 3.21.</b> Muestras que incumplen con la legislación de la Unión Europea .....	59
<b>Tabla 3.22.</b> Muestras que incumplen la legislación del Japón .....	59

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Estructura química del Profenofos .....	<b>8</b>
<b>Figura 1.2.</b> Estructura química del Metomil .....	<b>9</b>
<b>Figura 1.3.</b> Estructura química del Carbofuran .....	<b>10</b>
<b>Figura 1.4.</b> Estructura química del Carbarilo .....	<b>12</b>
<b>Figura 1.5.</b> Diagrama básico de un cromatógrafo líquido .....	<b>18</b>
<b>Figura 1.6.</b> Gráfica de van Deemter a distintos tamaños de partícula .....	<b>19</b>
<b>Figura 1.7.</b> Esquema del espectrómetro de masas doble utilizado en este estudio.....	<b>20</b>
<b>Figura 1.8.</b> Monitoreo de reacción múltiple o MRM.....	<b>23</b>
<b>Figura 2.1.</b> Cromatograma de Metomil, Carbofuran, Carbarilo y Profenofos en una matriz de brócoli.....	<b>31</b>
<b>Figura 2.2.</b> Tabla del cambio de la composición de la fase móvil en relación al tiempo .	<b>32</b>
<b>Figura 3.1.</b> Gráfica de la curva de calibración de Metomil .....	<b>44</b>
<b>Figura 3.2.</b> Gráfica de la curva de calibración de Carbofuran .....	<b>45</b>
<b>Figura 3.3.</b> Gráfica de la curva de calibración de Carbarilo .....	<b>45</b>
<b>Figura 3.4.</b> Gráfica de la curva de calibración de Profenofos .....	<b>45</b>
<b>Figura 3.5.</b> Gráfica de los residuales de la curva de calibración de Metomil .....	<b>47</b>
<b>Figura 3.6.</b> Gráfica de los residuales de la curva de calibración de Carbofuran .....	<b>48</b>
<b>Figura 3.7.</b> Gráfica de los residuales de la curva de calibración de Carbarilo.....	<b>48</b>
<b>Figura 3.8.</b> Gráfica de los residuales de la curva de calibración de Profenofos .....	<b>48</b>

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> “Esquema del método de análisis” .....	<b>70</b>
<b>Anexo 2:</b> “Cálculo de la curva de calibración mediante mínimos cuadrados” .....	<b>71</b>
<b>Anexo 3:</b> “Concentraciones obtenidas de los datos de la validación al aplicar la curva de calibración” .....	<b>73</b>
<b>Anexo 4:</b> “Datos y resultados de las muestras analizadas de brócoli” .....	<b>77</b>
<b>Anexo 5:</b> “Hojas de validación” .....	<b>82</b>
<b>Anexo 6:</b> “Certificados de los estándares utilizados” .....	<b>86</b>
<b>Anexo 7:</b> “Cromatograma de un blanco de solvente, blanco de matriz, estándar en matriz y una muestra” .....	<b>90</b>

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad hacer un estudio preliminar de residualidad de metomil, carbofuran, carbarilo y profenofos en brócoli en un punto de distribución de este producto en la ciudad de Quito, el Mercado Mayorista. Se implementó una variante del método 2007.01 de la AOAC para la determinación de estos plaguicidas usando la cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC- MS/MS) como técnica de separación y cuantificación.

Luego de las pruebas de validación el método comprobó ser confiable según los criterios de la norma SANCO/10684/2009 y de Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD). El porcentaje de recuperación para los cuatro analitos fue del 91% al 100%. Los rangos de trabajo en matriz fueron de 5 a 64  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para metomil, carbofuran, y carbarilo y para profenofos fue de 23 a 299  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , los cuales cubren las legislaciones vigentes.

Se analizaron treinta muestras de las cuales seis presentaron residuos de metomil y en dos de éstas se encontró residuos de profenofos. Según la normativa ecuatoriana la residualidad de estos plaguicidas no es permitida en brócoli, además, tampoco cumplen los requisitos para la exportación a la Unión Europea y Japón.

Palabras clave: Plaguicidas, brócoli, cromatografía líquida, espectrometría de masas tándem.

## ABSTRACT

The present dissertation conducted a preliminary study of pesticides residues of methomyl, carbofuran, carbaryl and profenofos in broccoli on the “Mercado Mayorista” from the city of Quito. The method implemented was based on the AOAC 2007.01 method using ultra-high pressure liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS).

After completing the validation process, this method proved to be suitable according to the criteria of the SANCO/10684/2009 norm and the Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD). The percentage of recovery reaches from 91% to 100% for all analytes. The range of work was established from 5 to 64  $\mu\text{g/Kg}$  for methomyl, carbofuran and carbaryl, whereas for profenofos it was 23 to 299  $\mu\text{g/Kg}$  which cover in force regulations.

Thirty samples were analyzed; six contained pesticide residues. These six samples contained the pesticides methomyl and profenofos which, according to Ecuadorian law, are not allowed for use on broccoli and are not suitable for exportation to the European Union or Japan.

Keywords: Pesticides, broccoli, liquid chromatography, tandem mass spectrometry

## INTRODUCCIÓN

Desde hace más de una década la cadena de producción de brócoli ha mostrado un fuerte crecimiento, debido a su importancia en la nutrición humana. Con el objetivo de mejorar el rendimiento y calidad de su producción se recurre al uso de plaguicidas que cumplen un papel importante en la industria agropecuaria a pesar de su problemática toxicológica. Por la toxicidad de algunos de estos plaguicidas, en la mayoría de países desarrollados, se ha intensificado el control de su uso en alimentos para evitar su aplicación inadecuada.

Existen más de 1,100 plaguicidas que son usados en algunas de las varias etapas de la producción, almacenamiento y distribución de productos agrícolas. Los residuos de estos plaguicidas, que permanecen en los alimentos, suponen un riesgo para la salud humana por su potencial toxicidad aguda y/o crónica <sup>[1]</sup>.

En el Ecuador existe poco o ningún control en el uso de plaguicidas y además, se ha encontrado la presencia de sus residuos en alimentos en niveles superiores a los permitidos, por esto, se plantea la necesidad de implementar metodologías analíticas usando instrumentos de última generación que permitan efectuar un análisis con altos niveles de sensibilidad y selectividad para proteger la salud del consumidor.

Actualmente, debido a su excelente versatilidad, países como Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Alemania, Suecia, Dinamarca, Japón, Holanda, entre otros, utilizan cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas/masas en sus programas de monitoreo de residuos de plaguicidas en alimentos de producción nacional e

importados <sup>[2]</sup>. Las características de la cromatografía líquida acoplada a masas en tándem son su alta sensibilidad y versatilidad, además de poder analizar plaguicidas problemáticos sin la necesidad recurrir de complicadas derivatizaciones. Esto hace a la cromatografía líquida acoplada a masas en tándem hacen una importante herramienta para el control y monitoreo de plaguicidas <sup>[1, 3]</sup>.

El presente trabajo, está entre los primeros efectuados en el país sobre la residualidad de plaguicidas en brócoli destinada para consumo, utilizando un cromatógrafo líquido de ultra alta eficiencia acoplado a un espectrómetro de masas en tándem (UHPLC-MS/MS). El estudio se llevó a cabo con el detector MS/MS más moderno y sensible en el país. Al ser este un equipo nuevo se tuvo que superar algunos inconvenientes como fueron: condiciones para la instalación del equipo, aprendizaje del software (Masslynx versión 4,1), verificación de las condiciones correctas del funcionamiento del detector y mantenimiento periódico del equipo para trabajar en condiciones óptimas.

En este estudio se adaptó una variante del método QuEChERS propuesto por Anastassiades et al. una técnica de análisis multiresiduos que optimiza los procesos de extracción y limpieza minimizando costo y tiempo del análisis además del tamaño de la muestra <sup>[4]</sup>.

Se analizaron cuatro plaguicidas en muestras de brócoli recolectadas del principal mercado de la ciudad de Quito, el Mercado Mayorista. Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Calidad y Residuos de Plaguicidas e Insumos Agropecuarios de AGROCALIDAD conforme con sus requerimientos y protocolos.

# CAPÍTULO I: PARTE TEÓRICA

## 1.1. EL BRÓCOLI.

El brócoli es una hortaliza originaria del Mediterráneo y Asia Menor. Es un cultivo de clima templado frío. Para su desarrollo óptimo se requieren temperaturas de 8 a 17 °C <sup>[5]</sup>. Pertenece a la familia *Brassicaceae* del género *Brassica* y de la especie *Brassica oleracea* del grupo itálica. Cada 100 gramos de brócoli crudo completo (tallo y flor) están compuestos por 90,69 g de agua, 5,24 g de carbohidratos, 2,98 g de proteína, y 0,35 g de grasa <sup>[6]</sup>. Además, cuenta con un alto contenido de vitaminas: A, B-6, C, E, K y de minerales: calcio, hierro, magnesio, fósforo, potasio, sodio, zinc, cobre, manganeso y selenio <sup>[7]</sup>.

Muchos de los plaguicidas causan daño en el ADN incluso en humanos. La dieta puede prevenir y en algunos casos revertir el daño al ADN <sup>[8]</sup>. Se ha demostrado que el consumo de brócoli ofrece una buena fuente de sulfarafane, un isocianato de documentada capacidad anticancerígena <sup>[6,7]</sup>. Investigaciones en animales indican que el sulfarafane posee una actividad de protección en contra carcinógenos incluyendo plaguicidas. Además, estudios epidemiológicos han reportado una relación inversa entre el consumo humano de isocianatos y el riesgo de cáncer de pulmón, seno y colon <sup>[8]</sup>.

Sus excelentes propiedades alimenticias y anticancerígenas lo convierten en un alimento importante para la dieta. Es un alimento que lo consumen personas de toda condición

social y edad, incluyendo niños, de ahí la importancia de mantener este alimento libre de residuos de plaguicidas.

El brócoli luego de cosecharse tiene una vida de 21 a 28 días, si se lo mantiene a una temperatura de 0 °C y una humedad de 95%, desafortunadamente los pequeños agricultores, que son quienes distribuyen el brócoli en los mercados, no cuentan con frigoríficos para el transporte o almacenamiento del brócoli, lo que reduce considerablemente el tiempo de vida del mismo, según la bibliografía al mantener el brócoli a 5 °C su tiempo de vida disminuye a la mitad <sup>[9]</sup>.

#### 1.1.1. EL BRÓCOLI EN ECUADOR.

Según el último Censo Agropecuario, la producción total de brócoli en el Ecuador ascendió a 48 678 Tm <sup>[10]</sup>, concentrándose su cultivo en la región andina con 3 417 hectáreas <sup>[11]</sup>. Cotopaxi es la principal provincia productora de brócoli, con el 68% de la producción, seguida por Pichincha e Imbabura que producen 16% y el 10% respectivamente teniendo estas tres zonas condiciones favorables para la producción todo el año <sup>[11]</sup>.

#### 1.1.2. PLAGAS QUE AFECTAN AL BRÓCOLI.

Existe un gran número de plagas causadas por insectos, ácaros, hongos y bacterias que afectan al brócoli. Algunas de las más importantes en nuestro país son: Minador de hojas (*Liriomyza trifolii* Burg.), Mosca de la col (*Chorthophilla brassicae* Bouche), Oruga de la col (*Pieris brassicae* L.), Gorgojo de las coles (*Ceuthorrhynchus pleurostigma* Marsch),

Polilla de las crucíferas (*Plutella xylostella* L.), Pulguilla de la col (*Phyllotreta nemorum* L.) y Pulgón de las coles (*Brevicoryne brassicae* L.) <sup>[12]</sup>.

## **1.2. LOS PLAGUICIDAS.**

Son sustancias o mezclas de sustancias, naturales o sintéticas, formuladas para eliminar o para repeler plagas que afecten a cultivos de alimentos para el consumo humano, vida animal, o que transmitan enfermedades tanto a seres humanos como animales <sup>[13]</sup>.

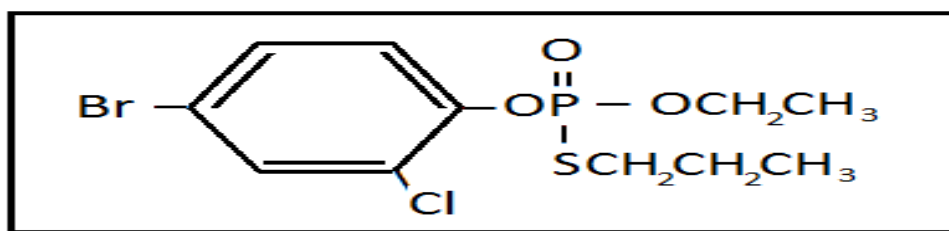
Gracias al uso de los plaguicidas se ha generado una mejora sustancial en la calidad y cantidad de la producción de alimentos, de la cual la demanda es cada día mayor, pero también ha traído consigo un sinnúmero de nuevos problemas concernientes a la salud del hombre, animales y a la contaminación del ambiente <sup>[14]</sup>.

En este estudio se analizaron cuatro plaguicidas: el organofosforado profenofos y tres carbamatos: carbofuran, carbarilo y metomil.

A continuación se describen las características principales de cada plaguicida analizado:

### **1.2.1. PROFENOFOS.**

Por su composición química es un plaguicida organofosforado, su nombre químico según la IUPAC es O-(4-bromo-2-clorofenil) O-etil S-propilfosforotionato. En la Figura 1.1 se puede apreciar su estructura química <sup>[15]</sup>.



**Figura 1.1. Estructura química del Profenofos <sup>[14]</sup>.**

El profenofos es un insecticida y acaricida no sistémico cuyo modo de acción es inhibir la colinesterasa. Se usa en el control de insectos y de ácaros en cultivos de brócoli, algodón, papas, tabaco, maíz entre otros <sup>[11]</sup>. En la Tabla 1.1 se encuentran las principales propiedades físico-químicas del profenofos.

**Tabla 1.1. Propiedades físico-químicas del Profenofos <sup>[14]</sup>.**

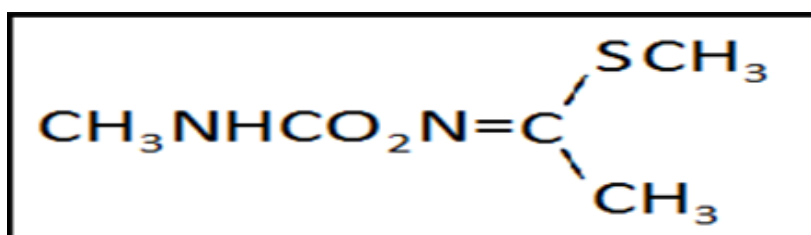
<b>Peso molecular</b>	<i>373.6 g/mol</i>
<b>Estado</b>	<i>Líquido</i>
<b>Presión de vapor</b>	<i>2.53 mPa (25°C)</i>
<b>Densidad relativa</b>	<i>1.455 g/ml (20°C)</i>

La Organización Mundial de la Salud (OMS), ubica al profenofos en la categoría II, moderadamente peligroso; y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (US-EPA), lo ubica en la categoría II, moderadamente tóxico <sup>[14]</sup>.

### 1.2.2. METOMIL

Es un insecticida y acaricida sistémico de amplio espectro cuyo modo de acción es inhibir la colinesterasa. Se usa para el control de una amplia gama de insectos, en particular lepidópteros, hemípteros, homópteros, dípteros y coleópteros además de ácaros <sup>[14]</sup>. Se utiliza en casi todo tipo de cultivos, entre ellos el brócoli.

Se lo clasifica por su composición química como Carbamato Oxima. Su nombre oficial según la IUPAC es S-metil-N-(metilcarbamoiloxi) tioacetimidato. En la Figura 1.2 se puede apreciar su estructura química <sup>[14]</sup>.



**Figura 1.2. Estructura química del Metomil <sup>[14]</sup>.**

El análisis de la residualidad de este compuesto ha supuesto un problema para los laboratorios del país, debido a que es termolábil, no se lo puede analizar por cromatografía de gases y no presenta una adecuada señal en los detectores ultravioleta/visibles, por lo que se lo debe derivatizar para su detección por fluorescencia <sup>[14]</sup>, lo que plantea varios problemas analíticos.

En la Tabla 1.2 se detallan las principales propiedades físico-químicas del metomil.

**Tabla 1.2. Propiedades físico-químicas del Metomil <sup>[14]</sup>.**

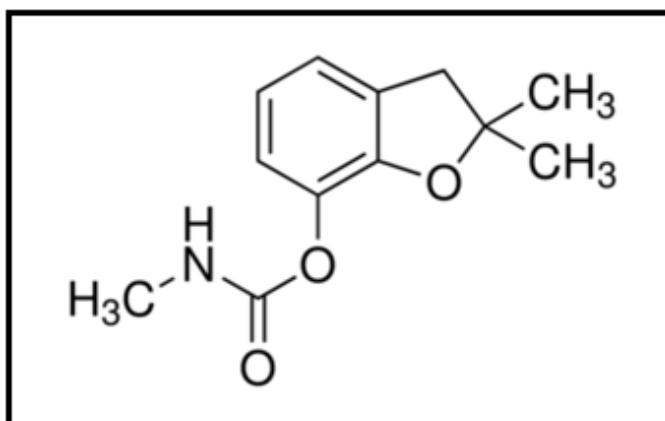
<b>Peso molecular</b>	<i>162.2 g/mol</i>
<b>Estado</b>	<i>Sólido cristalino</i>
<b>Punto de fusión</b>	<i>78-79 °C</i>
<b>Presión de vapor</b>	<i>0.72 mPa (25°C)</i>
<b>Densidad relativa</b>	<i>1.2946 g/ml (25°C)</i>

La OMS cataloga al metomil como IB, altamente peligroso; mientras que la US-EPA lo cataloga como I, la categorización de mayor toxicidad <sup>[14]</sup>.

### 1.2.3. CARBOFURAN

Es un insecticida, acaricida y nematocida sistémico de amplio espectro inhibidor de la colinesterasa. No tiene efecto bioacumulativo y, correctamente aplicado, no presenta acción fito-tóxica. Es moderadamente persistente en el suelo, con una permanencia de 30 a 120 días. Es utilizado en gran variedad de frutas, cultivos y vegetales, entre ellos el brócoli. Puede ser absorbido mediante inhalación, contacto con la piel o ingestión y es altamente tóxico en mamíferos <sup>[14,16]</sup>.

Es un carbamato, su nombre químico asignado por la IUPAC es 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilcarbamato <sup>[15]</sup>. En la Figura 1.3 se puede observar su estructura química.



**Figura 1.3. Estructura química del Carbofuran <sup>[16]</sup>.**

En la Tabla 1.3 se detallan las propiedades físico-químicas del Carbofuran.

**Tabla 1.3. Propiedades físico-químicas del Carbofuran <sup>[16]</sup>.**

<b>Peso molecular</b>	<i>221.26 g/mol</i>
<b>Estado</b>	<i>Sólido cristalino</i>
<b>Punto de fusión</b>	<i>150- 152 °C</i>
<b>Presión de vapor</b>	<i>0.072 mPa (25°C)</i>
<b>Densidad relativa</b>	<i>1.18 g/ml (25°C)</i>

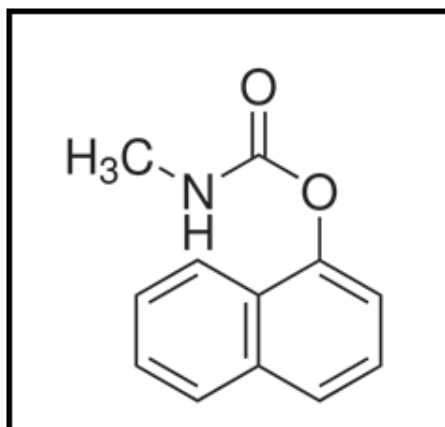
La Organización mundial de la Salud clasifica al carbofuran como plaguicida IB, altamente peligroso. La Agencia de protección ambiental US-EPA lo clasifica como I, altamente tóxico <sup>[14]</sup>.

#### 1.2.4. CARBARILO

Es un insecticida y acaricida de amplio espectro de uso agrícola y pecuario con ligeras propiedades sistémicas. Su modo de acción es inhibir la colinesterasa. Es utilizado en cultivos de brócoli, algodón, frutas, entre otros para el control de lepidóptera, coleóptera e insectos chupadores en muchos cultivos y de ectoparásitos <sup>[17]</sup>.

Es un carbamato, su nombre químico asignado por la IUPAC es 1-naftilmetilcarbamato <sup>[16]</sup>.

Su estructura química se presenta en la Figura 1.4.



**Figura 1.4. Estructura química del Carbarilo** <sup>[17]</sup>.

En la Tabla 1.4 se describen algunas propiedades físico-químicas del Carbarilo.

**Tabla 1.4. Propiedades físico-químicas del Carbarilo** <sup>[17,18]</sup>.

<b>Peso molecular</b>	<i>201.22 g/mol</i>
<b>Estado</b>	<i>Sólido cristalino</i>
<b>Punto de fusión</b>	<i>142- 145 °C</i>
<b>Presión de vapor</b>	<i>4.16x 10<sup>-2</sup> mPa (23.5°C)</i>
<b>Densidad relativa</b>	<i>1.232 g/ml (25°C)</i>

La Organización mundial de la Salud OMS clasifica al carbarilo como II, moderadamente peligroso. La US-EPA lo clasifica como II, moderadamente tóxico <sup>[14]</sup>.

### **1.3. CONSECUENCIAS DEL USO DE PLAGUICIDAS EN LA AGRICULTURA EN ECUADOR.**

La aplicación de plaguicidas para la protección de cultivos en el Ecuador es alta. En muchos casos se usan de manera inadecuada sin seguir las recomendaciones técnicas

apropiadas para prevenir la exposición de los trabajadores agrícolas, limitar la presencia de residuos en alimentos y para proteger el ambiente.

Este problema se vuelve aún más crítico en el caso de los pequeños productores. Muchos campesinos no pueden identificar las plagas de sus cultivos y equivocan las medidas de control a seguir; tampoco toman en cuenta que existen plaguicidas más apropiados para determinada plaga y cultivo y no respetan los tiempos de carencia. Además, ciertos agricultores erróneamente creen que el plaguicida más tóxico es el más adecuado. El resultado de esto es que los alimentos de uso interno se encuentren contaminados con residuos de diversos plaguicidas.

Las grandes compañías que producen alimentos como productos de exportación, al contrario de los pequeños productores, cumplen con rigurosos procedimientos y controles exigidos por los mercados internacionales.

#### **1.4. MONITOREO Y CONTROL DE PLAGUICIDAS EN ALIMENTOS EN ECUADOR.**

El país no cuenta con un programa de monitoreo continuo de residuos de plaguicidas en alimentos y los datos que se tienen han sido obtenidos por trabajos de investigación aislados. Recientemente, algunos supermercados, restaurantes y compañías procesadoras de alimentos empiezan lentamente a exigir a sus proveedores que cumplan con ciertas normas fitosanitarias como límites en los residuos de plaguicidas, pero esto es algo que está motivado por iniciativas internas y bastante limitado por los altos costos de los análisis.

El Ecuador aun no dispone de una red de laboratorios avalados por los organismos competentes para realizar monitoreos de plaguicidas en alimentos, ni con un laboratorio de referencia que verifique que los integrantes de la red cumplan con requerimientos que aseguren la calidad de los datos que generan. Además, existe una limitada capacidad de los laboratorios para analizar todos los posibles contaminantes. Todo esto hace necesario que se implementen de manera conjunta programas para el mejoramiento de las prácticas agropecuarias, mejora en la capacidad analítica de los laboratorios de los organismos de control y programas de monitoreo de residuos de plaguicidas con el fin de proteger la salud tanto de los productores como de los consumidores.

### **1.5. NORMATIVA NACIONAL E INTERNACIONAL**

La legislación ecuatoriana acoge como propias las normas establecidas en el *Codex-Alimentarius* y en el caso de exportaciones, las exigidas por el país de destino.

El Ecuador es el sexto exportador mundial de brócoli, siendo sus principales destinos Estados Unidos, Alemania y Japón. Con este antecedente, para este estudio se tomaron en cuenta los límites máximos residuales establecidos por el *Codex-Alimentarius* y las entidades reguladoras de los destinos de exportación.

El *Codex-Alimentarius* no estipula el uso de profenofos, carbofuran, carbarilo o metomil en brócoli. Si se detectan residuos de alguno de estos plaguicidas en el cultivo se infringiría dicha normativa <sup>[19]</sup>.

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, mediante la Foreign Agricultural Service, FAS, ha establecido un límite máximo de residuos de 10 mg/Kg de carbarilo y 2 mg/Kg de metomil. No ha establecido un límite máximo de residuos para profenofos ni carbofuran <sup>[20]</sup>.

La Comisión Europea, mediante la Dirección General de la Salud y Protección de los Consumidores DG-SANCO, establece un límite máximo residual de carbofuran y metomil de 0,02 mg/Kg, mientras que de carbarilo y profenofos es de 0,05 mg/Kg <sup>[21]</sup>.

Japón, mediante las regulaciones establecidas por “The Japan Food Chemical Research Foundation”, admite un máximo de 0,5 mg/Kg de carbofuran; 6 mg/Kg de carbarilo; 2 mg/Kg de metomil y 0,05 mg/Kg de profenofos en brócoli <sup>[22]</sup>.

## **1.6. ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS.**

### **1.6.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

Los organismos de control buscan implementar planes cada vez más ambiciosos para monitorear la residualidad de plaguicidas en alimentos. En el año 2003, Anastassiades et al publicaron un nuevo método que revolucionó el análisis de plaguicidas en alimentos en todo el mundo. Esta técnica llamada QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) fue rápidamente adoptada por los organismos de control de Estados Unidos y de Europa, haciendo que hoy en día sea el método de referencia en la mayor parte de laboratorios a nivel mundial <sup>[2]</sup>.

Hoy en día, variaciones de esta metodología son aplicadas, incluso, para la extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos, antibióticos y drogas veterinarias en alimentos <sup>[23]</sup>. Es un método relativamente simple y rápido, compuesto de dos partes, la primera consiste en extraer con un solvente, un amplio espectro de plaguicidas: organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides, en la segunda se realiza una limpieza del extracto por extracción dispersiva en fase sólida, además esta metodología es compatible con la espectrometría de masas <sup>[4, 15]</sup>. A continuación se describe más detalladamente esta técnica de extracción y limpieza.

En el primer paso se realiza una extracción de todos los analitos con acetonitrilo en presencia de sulfato de magnesio y cloruro de sodio, mediante agitación <sup>[15]</sup>. En el segundo los coextractantes presentes en el extracto son retenidos por partículas en suspensión que tienen afinidad únicamente por los mismos y no por los analitos, técnica conocida como dispersión en fase sólida <sup>[24]</sup>. Las sales usadas en el primer paso separan las fases orgánica y acuosa, además disminuyen la solubilidad de los analitos en la fase acuosa provocando que migren a la fase orgánica. En este paso también se separan las partículas insolubles de la muestra, ya que se toma toda o una fracción de la fase orgánica. Una modificación del método supone añadir citrato o acetato de sodio con el fin de bajar el pH, debido a que la mayoría de plaguicidas son estables a un pH ácido <sup>[24]</sup>.

Los compuestos que se usan para la limpieza del extracto son generalmente: una combinación de amina primaria y secundaria conocida como PSA, un intercambiador aniónico débil que retiene interferentes polares como ácidos grasos, pigmentos polares y azúcares, carbón grafitado que retiene compuestos planares como la clorofila y sulfato de

magnesio que eliminar residuos de agua <sup>[4]</sup>, partículas de C18 que eliminan compuestos como lípidos, colesterol y vitaminas liposolubles <sup>[23]</sup>.

La relación entre el peso de la muestra y el solvente utilizado para la extracción es de 1 g de muestra por ml de solvente. Variando esta proporción dependiendo de la cantidad de agua de la muestra, siendo menor mientras menos agua tenga la muestra. También se debe explicar que al momento de la extracción debe estar presente una cierta cantidad de agua similar a la de la fase orgánica <sup>[25]</sup>.

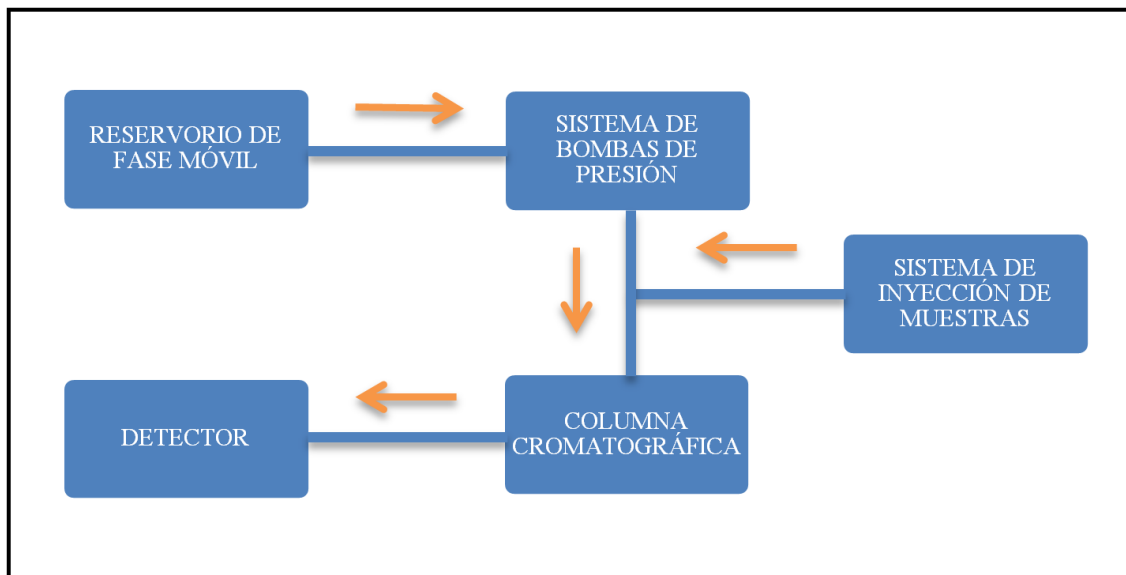
Este método es compatible tanto con cromatografía líquida como de gases. La diferencia radica en el solvente en el que se inyecta para cada una de estas técnicas. Para cromatografía de gases se hace un cambio de solvente, evaporando a sequedad el acetonitrilo y reconstituyendo con solventes como isooctano o hexano. Para cromatografía líquida se diluye el extracto con con una porción de fase móvil acuosa para lograr una buena cromatografía <sup>[34]</sup>.

Los detectores utilizados con esta técnica son los espectrómetros de masas, debido a su naturaleza de amplio espectro y que además permiten la confirmación de la identidad de los analitos.

#### 1.6.2. SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.

La cromatografía líquida es una técnica de separación que se basa en los diferentes grados de afinidad que tiene cada uno de los compuestos de una mezcla con la fase móvil y la

estacionaria, éstas entre ellas inmiscibles <sup>[26]</sup>. En la Figura 1.5 se representa un esquema general de un cromatógrafo líquido.



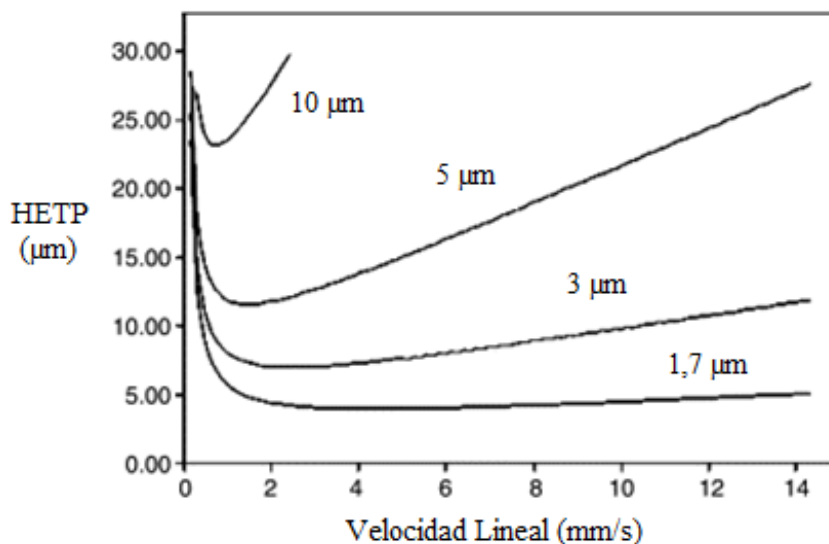
**Figura 1.5. Diagrama básico de un cromatógrafo líquido <sup>[26]</sup>.**

El sistema de bombeo transfiere la fase móvil de su reservorio a través de la columna cromatográfica al detector. La muestra, luego de la inyección, pasa a la columna cromatográfica donde es separada y estas fracciones llegan al detector <sup>[26]</sup>.

En el análisis de residuos de plaguicidas, la cromatografía en fase reversa es una de las técnicas más ampliamente usadas debido a su compatibilidad con gran parte de los plaguicidas no persistentes <sup>[27]</sup>.

Dentro de la cromatografía líquida el más reciente avance es la disminución del tamaño de partícula del empaquetamiento de la columna a un diámetro de menos de 2  $\mu\text{m}$  y lograr la resistencia física del material de empaque a presiones del orden de los 15 000 psi, en algunos casos incluso más, aumentando así la eficiencia y sensibilidad <sup>[27]</sup>.

La Figura 1.6 ilustra la ecuación de van Deemter a distintos tamaños de partícula, donde se puede apreciar que con un tamaño de partícula de 1,7  $\mu\text{m}$ , la eficiencia de la columna casi no disminuye al aumentar la velocidad lineal <sup>[28]</sup>.



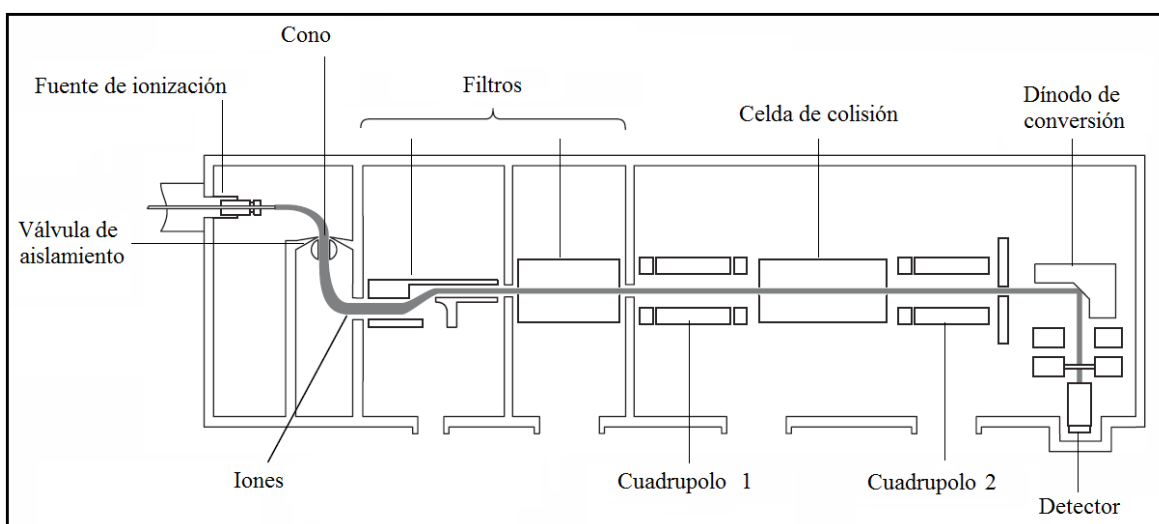
**Figura 1.6. Gráfica de van Deemter a distintos tamaños de partícula <sup>[28]</sup>.**

El efecto negativo de disminuir el tamaño de partícula es el aumento de la presión producida por la columna en alrededor de 9 veces más en comparación con columna de 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula. Lo que puede ser compensado por la disminución del tamaño de las columnas sin perder resolución y disminuyendo el consumo de solventes y tiempo de análisis <sup>[28]</sup>.

Esta nueva tecnología ha conducido a la construcción de equipos capaces de trabajar a presiones compatibles, denominándose genéricamente como cromatógrafos líquidos de ultra alta eficiencia, UHPLC <sup>[27]</sup>.

### 1.6.3. ESPECTRÓMETRO DE MASAS DOBLE

En la actualidad el espectrómetro de masas doble es uno de los detectores más utilizado en la química analítica aplicada al medio ambiente, alimentos y salud pública por su alta sensibilidad, versatilidad y seguridad en los resultados.



**Figura 1.7. Esquema del espectrómetro de masas doble utilizado en este estudio <sup>[29]</sup>.**

La Figura 1.7 muestra las principales partes del espectrómetro de masas doble utilizado en este estudio. Luego de salir de la columna cromatográfica los analitos llegan a la fuente de ionización, y pasan de estar en solución a partículas ionizadas libres, que son atraídas al cono por la aplicación de diferencia de potencial, luego pasan por filtros que eliminan cualquier molécula neutra los focalizan llevándolos, a los iones, al primer analizador de masas, a la celda de colisión y al segundo analizador y finalmente a un detector <sup>[29]</sup>. El proceso instrumental de análisis utilizado en este trabajo se explica con más detalles a continuación.

### 1.6.3.1. Ionización por electrospray.

Este tipo de ionización es aplicable a cromatografía líquida y es comúnmente utilizada en el análisis de residuos de plaguicidas polares. Es una ionización suave ya que no se generan muchos fragmentos y funciona mejor cuando la solución, fase móvil, tiene un alto porcentaje de composición orgánica ya que facilita la desolvatación. Además, la presencia de iones en solución ayuda a formar iones moleculares protonados, desprotonados o aductos que generan una mayor señal <sup>[27]</sup>.

La solución a analizar, después de pasar por la columna cromatográfica, pasa por un tubo capilar en el cual es sometida a alto voltaje generándose iones en solución agrupados, dependiendo de la polaridad de la carga, iones positivos en el medio o en las paredes. Esta solución es dispersada a la salida del capilar al ser sometida a una corriente de nitrógeno (gas nebulizador) formándose así droplets (gotas cargadas) con carga positiva o negativa. Luego, por efecto de la temperatura de la cámara y la acción del gas de desolvatación (nitrógeno), el solvente presente en los droplets se va evaporando haciendo a estos cada vez más pequeños. Los droplets tienen en su interior iones con la misma carga y estos al acercarse cada vez más, debido a la eliminación del solvente, se ven repelidos entre ellos con mayor fuerza y finalmente son expulsados del droplet, produciendo iones suspendidos. Después, aplicando una diferencia de potencial, estos iones son dirigidos hacia el cono donde pasan a una segunda cámara <sup>[27]</sup>.

Para poder entrar por el cono, las partículas tienen que superar una corriente de nitrógeno, lo que impide que las partículas que no estén cargadas ingresen. Los iones son transferidos a una cámara de alto vacío donde son condensadas y direccionadas a los cuadrupolos, esta

cámara en el equipo utilizado se llama “step way”, donde hacen un camino parecido a una zeta, a diferencia de lo que sucede en los hexapolos, comúnmente utilizados en estos equipos, para así asegurar que sólo iones y no moléculas neutras ingresen a los cuadrupolos<sup>[29]</sup>.

#### 1.6.3.2. Cuadrupolos.

Son un conjunto de cuatro varillas paralelas equidistantes del centro. A través de la aplicación de una combinación de voltajes alternos y continuos los iones pueden pasar selectivamente por su relación masa carga. Dependiendo del voltaje aplicado, los iones pasarán o chocarán contra las varillas del cuadrupolos y perderán su carga<sup>[26]</sup>.

#### 1.6.3.3. Celda de colisión.

Es una serie de anillos paralelos con voltajes continuos y de radiofrecuencia en cada par de anillos adyacentes. En ella se producen choques de iones con átomos de argón en la celda con el fin de fragmentar a los iones<sup>[29]</sup>.

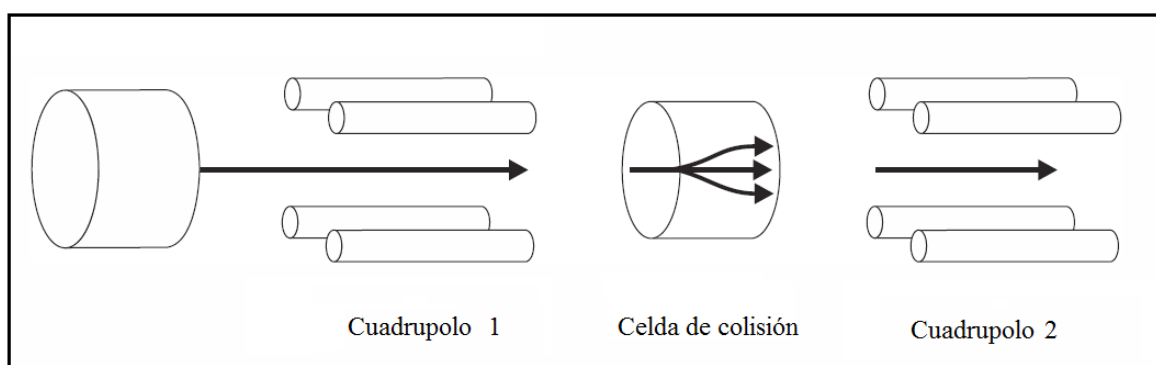
#### 1.6.3.4. Detector.

El sistema de detección consta básicamente de un dinodo de conversión en el cual chocan los iones, generando electrones<sup>[29]</sup>.

### 1.6.3.5. Modos de adquisición de datos.

Estos equipos tienen una gran diversidad de aplicaciones tanto en el ámbito de la identificación de compuestos como la cuantificación de ultra-trazas o inclusive para realizar estos análisis simultáneamente. Todo esto depende principalmente de la sincronización de los dos analizadores de masas y la celda de colisión <sup>[29]</sup>.

Para este estudio se utilizó el monitoreo de reacción múltiple o MRM por sus siglas en inglés. Es la técnica más ampliamente usada para la cuantificación en sistemas de cuadrupolo tándem, puesto que minimiza al máximo la presencia de interferentes obteniéndose una alta sensibilidad y selectividad <sup>[27]</sup>.



**Figura 1.8. Monitoreo de reacción múltiple o MRM <sup>[29]</sup>.**

Como se muestra en la Figura 1.8 un ion del analito es seleccionado en el primer analizador, ion precursor, y pasa a la celda de colisión donde es fragmentado, mediante una energía de colisión específica. Se selecciona un fragmento de este en el segundo cuadrupolo este pasa al detector. El proceso se repite variando la energía de colisión para tantos fragmentos del ion padre como sean necesarios, normalmente se monitorean dos <sup>[27]</sup>.

#### 1.6.3.6. Ventanas de análisis y duel

Otro parámetro a definir son las ventanas de análisis y el duel. Las ventanas de análisis son rangos de tiempo en que el detector estará monitoreando determinados fragmentos, éstas pueden estar superpuestas dependiendo de la necesidad. El duel determina el tiempo que el equipo monitorea un ion para obtener un punto en el cromatograma. El resultado práctico del uso del duel es aumentar o disminuir el número de puntos que el equipo obtiene para formar un pico cromatográfico. Un duel muy alto mejora la sensibilidad, pero disminuye el número de puntos por segundo que se tiene <sup>[30]</sup>.

Este parámetro tiene especial importancia cuando se monitorea más de un ion en una misma ventana, como en el caso de MRM y más cuando co-eluyen varios analitos. Además, debido a la utilización de la tecnología de UHPLC los picos cromatográficos son mucho más angostos, llegando incluso a tener unos pocos segundos de ancho, lo que implica que el detector del equipo tiene que hacer más escaneos por segundo que en un equipo convencional de HPLC <sup>[31]</sup>.

### 1.7. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

El objetivo de cualquier medición analítica es obtener información consistente, confiable y precisa. Los métodos analíticos validados juegan un papel muy importante en el cumplimiento de este objetivo. Según norma ISO/IEC 17 025 “la validación es la confirmación, a través del examen y aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto” <sup>[32]</sup> es decir, demostrar que el

método genera resultados de calidad para su necesidad específica. La validación de un método constituye una parte integral de las buenas prácticas analíticas <sup>[33, 34]</sup>.

Para validar un método, se realizan varias pruebas, y los resultados de las mismas son sometidos a un análisis estadístico. De este análisis se calcula el límite de detección, límite de cuantificación, coeficiente de linealidad, porcentaje de recuperación, precisión y la incertidumbre del método. Además, de estos parámetros se debe asegurar la especificidad del método. El proceso de validación tiene que ser llevado a cabo tomando en cuenta todos los requerimientos y capacidades del laboratorio; asimismo, debe ser eficiente en términos de costo y tiempo <sup>[33, 34]</sup>.

En este trabajo se utilizó un método oficial de la AOAC para el análisis de muestras de brócoli, al cual se le sometió a un proceso de validación de acuerdo a lo que se expone en el siguiente capítulo.

## **CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL**

Para el análisis de profenofos, metomil, carbarilo y carbofuran en muestras de brócoli se realizó la estandarización y validación del método de análisis de acuerdo a lo descrito a continuación.

### **2.1. EQUIPOS Y MATERIALES**

#### **2.1.1. EQUIPOS**

Se utilizó un UHPLC modelo Acquity acoplado a un espectrómetro MS/MS modelo XEVO TQ-S (ambos de Waters Corporation); una columna cromatográfica Acquity UPLC BEH C18 de 1,7  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, 2,1 mm de diámetro interno, 50 mm de longitud<sup>[15]</sup> y de número de serie 01863032215788. Las partículas del material de empaque de la columna son de 140 Å de diámetro de poro y un área superficial de 185 m<sup>2</sup>/g con un contenido de carbón total de 17.64%. Se utilizó un homogenizador Oster; una centrífuga Sigma 3k 15; un vórtex modelo Daigger Genie 2; una balanza Mettler-Toledo modelo ML150E/01 y una balanza marca Kern modelo ABT 220-5DM; micro-jeringas marca Hamilton de émbolo flexible con agujas de acero inoxidable y punta roma de 10, 50, 100 y 500  $\mu\text{l}$ ; pipeta automática de 10 ml marca Termo Scientific y micropipetas automáticas de 100 y 1 000  $\mu\text{l}$  marca Droptek.

### 2.1.2. MATERIALES

Filtros hidrofílicos Millex con tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  y de 13 mm de diámetro; viales de 2 ml ámbar marca Waters; tubos falcon de 50 ml; Balones volumétricos marca Brand y Glassco clase A.

### 2.1.3. REACTIVOS

Para la extracción se utilizó: acetonitrilo grado HPLC de marca Fermont y agua tipo 1; kits QuEChERS de Waters Corporation que consisten de dos tubos falcon, el primero (tubo 1) de 50 ml que contiene 1,5 g de citrato de sodio, 1 g de cloruro de sodio, 4 g de sulfato de magnesio para la extracción de los analitos y segundo de 2 ml que contiene 150 mg de sulfato de magnesio, 25 mg de PSA y 25 mg de C18 para la posterior limpieza.

Para el análisis cromatográfico se usó metanol LiCrosolv tipo “hypergrade for LC – MS” y agua ultra pura tipo 1 de 18,2 M $\Omega$ cm de resistividad. Como modificadores de las fases móviles se usaron acetato de amonio y ácido acético. Para los sistemas de lavado de sellos y de inyección de muestras se utilizó mezclas acidificadas de acetonitrilo y metanol LiCrosolv tipo “hypergrade para LC – MS” e isopropanol LiCrosolv grado HPLC.

Se usó estándares analíticos de los siguientes compuestos de la casa comercial Dr. Ehrenstorfer: profenofos Lote 00805; carbarilo Lote 90308; carbofuran Lote 80820; metomil Lote 90417. Coctel de plaguicidas “pesticide-Mix 54” previamente preparados Lote 10607EA.

## 2.2. MÉTODOS

Se tomó como referencia el método 2007.01 “*Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate*” de la AOAC INTERNACIONAL [36]. El análisis instrumental se realizó por medio de UHPLC-MS/MS.

### 2.2.1. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO INSTRUMENTAL

En este estudio se aplicó una metodología avanzada, para la determinación de plaguicidas en brócoli, teniendo primero que adaptarla a las condiciones específicas existentes en el Laboratorio de Calidad y Residuos de Plaguicidas e Insumos Agropecuarios de AGROCALIDAD.

#### 2.2.1.1. Calibración

La verificación de la calibración del detector masas tándem comprende dos pasos principales:

- Exactitud de masa/carga: Inyección directa al detector de una solución de calibración de masas/carga, esta es adquirida directamente al proveedor del equipo. En este procedimiento verificamos que las masas/carga que lee el equipo efectivamente son correctas. De no ser así, se realiza una auto calibración usando la misma solución [29].

- Resolución de masa/carga: Inyección directa de una solución de calibración de resolución de masa/carga al detector. En este caso el objetivo es encontrar las condiciones adecuadas para que el detector pueda diferenciar entre masas/cargas cercanas sin comprometer la sensibilidad. El software realiza el cálculo para obtener la resolución entre picos y determinar si para o no la prueba <sup>[29]</sup>.

#### 2.2.1.2. Seteo de masas

Terminada la calibración se procedió al “seteo de masas” en donde se optimizaron las condiciones específicas para obtener la mejor señal posible para cada analito. Esto consistió en ir variando el voltaje del capilar, voltaje del cono, temperatura de desolvatación y fuente, flujo del gas de desolvatación y cono hasta encontrar las mejores condiciones para cada analito <sup>[29]</sup>.

En la Tabla 2.1 se describe las condiciones utilizadas en el presente trabajo y las utilizadas en el trabajo de Mastovska et al., del “Journal of Agricultural and Food Chemistry” <sup>[15]</sup> para un equipo de características similares.

Las principales diferencias se describen a continuación: La temperatura de desolvatación y el flujo del gas de desolvatación son mayores con el fin de aumentar la eficiencia de la desolvatación; debido a tener un cono de mayor abertura se optó por aumentar el flujo del gas del cono para disminuir la cantidad de partículas neutras que ingresen al equipo. Esta mayor abertura también nos permite trabajar a un solo voltaje de cono debido a que se facilita a que los iones ingresen al detector. Además, por tratarse de un equipo mucho más sensible que el utilizado en la referencia mencionada anteriormente, se trabajó al 5 por

ciento de su sensibilidad. Los parámetros que no se especifican en la publicación están señalados como “no aplica”.

**Tabla 2.1. Parámetros instrumentales del detector de masas tándem.**

<b>Parámetros</b>	<b>Parámetros utilizados</b>	<b>Parámetros propuestos en la literatura <sup>[15]</sup>.</b>
Ionización	Electrospray positiva	Electrospray positiva
Voltaje del capilar (Kv)	1,0	1,7
Voltaje del cono (V)	20	Variable
Temperatura de la fuente (°C)	150	130
Temperatura de desolvatación (°C)	550	350
Flujo del gas del cono; nitrógeno (l/hora)	200	100
Flujo del gas de desolvatación; nitrógeno (l/hora)	900	600
Flujo del gas de colisión; argón (ml/minutos)	0,15	no aplica
Presión del gas de nebulización; nitrógeno (Bar)	7	no aplica
Resolución de masas bajas MS1	2,6	no aplica
Resolución de masas altas MS1	14,9	no aplica
Resolución de masas bajas MS2	2,7	no aplica
Resolución de masas altas MS2	15,0	no aplica
Sensibilidad del fototubo multiplicador (%)	5	100

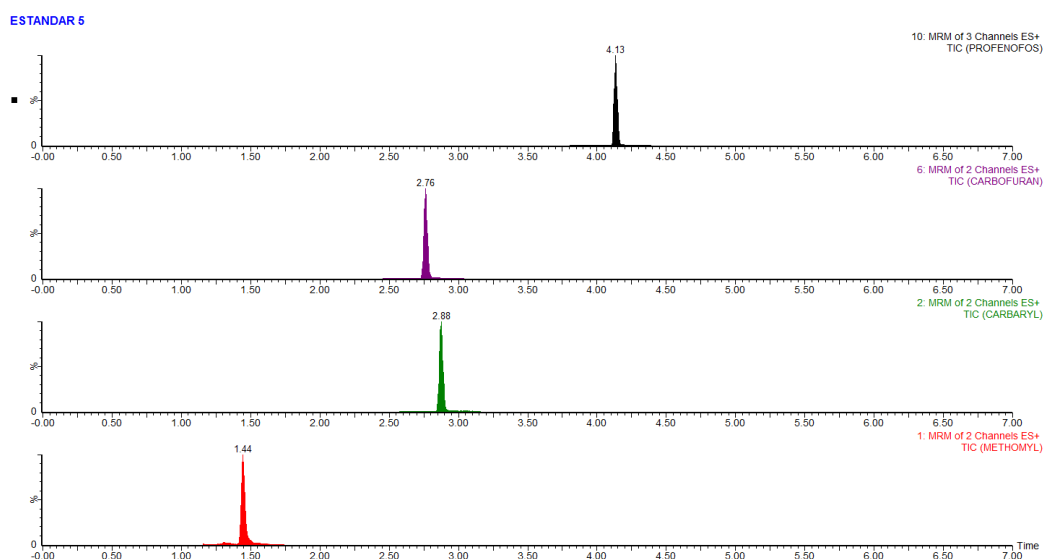
Se determinó la energía de colisión específica que produce el fragmento hijo más abundante, siendo éste con el cual se realizó la cuantificación y un segundo ion hijo con el cual se realizó la cualificación del analito. En la Tabla 2.2 se detallan los parámetros más importantes en el seteo de masas.

**Tabla 2.2. Condiciones específicas de operación para cada analito** <sup>[1, 2, 15, 37]</sup>.

Compuesto	Ion padre (m/z)	Voltaje del cono (V)	Iones hijos (m/z)	Energía de colisión (eV)
Profenofos	373.03	2	302.92	18
	373.03	2	344.92	12
Metomil	163.08	2	88.10	12
	163.08	2	106.00	8
Carbofuran	222.11	2	165.09	10
	222.11	2	123.00	20
Carbarilo	202.10	4	144.90	10
	202.10	4	127.04	26

### 2.2.1.3. Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas se optimizaron con el fin de disminuir el efecto matriz y obtener picos gaussianos. En la Figura 2.1 se presenta el cromatograma de un coctel de estándares de Metomil, Carbarilo, Carbofuran a una concentración de 13 µg/Kg y de Profenofos a una concentración a una concentración de 60 µg/Kg en matriz brócoli, por lo que se puede observar no existen interferencias por parte de la matriz y además los picos de los analitos tienen una forma gaussiana.



**Figura 2.1 Cromatograma de Metomil, Carbofuran, Carbarilo y Profenofos en una matriz de brócoli**

La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando un gradiente de dos eluyentes: el eluyente A (acuoso) compuesto por una solución acuosa con 10 mM de acetato de amonio al 0,1% de ácido acético, y el eluyente B (orgánico) compuesto por metanol con 10 mM de acetato de amonio al 0,1% de ácido acético.

En la Figura 2.2 se muestran los cambios de proporción de los eluyentes versus el tiempo. Se mantuvo por 0.5 min una proporción de 90% A y 10% B para que todos los analitos sean retenidos en el inicio de la columna; luego, se aumentó lentamente la proporción del eluyente B, para que paulatinamente eluyan los plaguicidas, saliendo primero los más afines al eluyente acuoso y los más afines al eluyente orgánico al último. Luego, se mantuvo alta la proporción del eluyente orgánico para que se limpie la columna de cualquier compuesto que pudiese haber quedado retenido en la columna. Finalmente se regresó a la concentración inicial del gradiente para equilibrar la columna. El tiempo total de cada corrida fue de 5,75 min a un flujo de 0,500 ml/min, una temperatura del horno de la columna de 40,0 °C y una presión del sistema máxima de 8 250 psi.

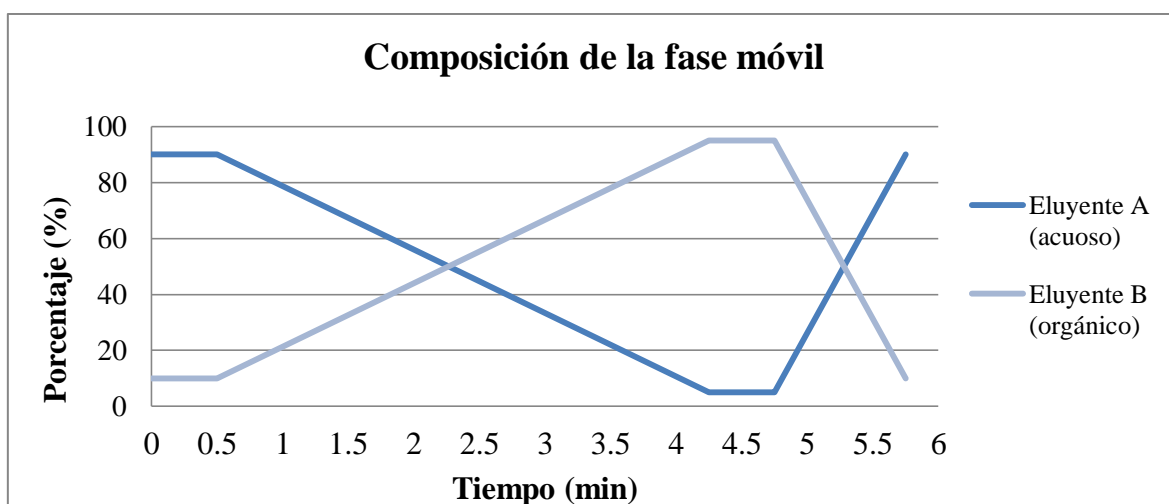


Figura 2.2. Tabla del cambio de la composición de la fase móvil en relación al tiempo.

Se determinaron las proporciones de eluyente orgánico y acuoso que debería tener la dilución final para mantener la forma gaussiana de los picos y disminuir el efecto matriz sin comprometer los límites de detección. Siendo la adecuada 80 % de eluyente acuoso.

El “carry over” se produce cuando residuos de componentes de la o las inyecciones anteriores permanecen en el sistema y contaminan a las siguientes inyecciones, esto es una de las fuentes de falsos positivos. Con el fin de reducir el “carry over” el sistema de inyección se lavó con dos mezclas distintas de solventes: una llamada de lavado débil constituida de agua/acetonitrilo 90:10 y otra llamada lavado fuerte conformada de isopropanol/metanol/acetonitrilo/ácido fórmico 33,3/33,3/33,3/0,1, esto después de cada inyección <sup>[38]</sup>. Además, se hicieron inyecciones de blancos de solvente después de cada inyección de muestra o estándar.

### 2.2.2. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

El procedimiento utilizado en este trabajo es basado en el método 2007.01 de la AOAC. El fin de la estandarización del método de extracción es optimizarlo a las condiciones específicas del laboratorio, tomando en cuenta factores como: porcentaje de recuperación de los analitos, interferencias debido al efecto matriz, costo y tiempo de análisis.

En general para facilitar la homogenización de material vegetal se utiliza nitrógeno líquido o hielo seco al momento de triturar las muestras. En el presente estudio por motivos de costo y disponibilidad se procedió a utilizar 75 ml de agua tipo 1 para facilitar la disgregación del tejido vegetal.

Se agregaron las sales en el tubo falcon de 50 ml (tubo 1) y se produce una reacción exotérmica. Para evitar la descomposición de los plaguicidas debido al incremento de la temperatura se colocó previamente en un congelador el tubo en un congelador.

Es importante destacar que en el paso final se efectuó una dilución de la muestra de uno a factor 5, disminuyendo drásticamente el efecto matriz y el ruido <sup>[38]</sup>; caso opuesto en comparación con otros métodos que con el fin de alcanzar mejores niveles de cuantificación, concentran la muestra aumentando así también el ruido, las interferencias y por ende disminuyendo la calidad del análisis.

#### 2.2.2.1. Protocolo del método extracción de plaguicidas.

Homogenización de la muestra:

Las muestras de brócoli que llegaron al laboratorio se homogenizaron cortándolas en pedazos pequeños. Se pesaron alrededor de 165 g, se licuó añadiendo 75 g de agua tipo 1, formándose así una pasta homogénea.

Extracción de los analitos:

Se tomaron 15 g de la pasta en un tubo falcon de 50 ml, se añadieron 10 ml de acetonitrilo y se colocó en un congelador por 15 min, luego se agregó 1,5 g de citrato de sodio, 1 g de cloruro de sodio, 4 g de sulfato de magnesio del tubo 1. Se agitó en un vórtex por 10 min y se centrifugó por 5 min a 3 000 rpm.

Limpieza del extracto:

Se tomó 1 ml del sobrenadante colocándolo en el tubo 2 (contiene 150 mg de sulfato de magnesio, 25 mg de PSA y 25 mg de C18) para luego mezclar en un vórtex por 10 min y llevar a centrifugación por 5 min a 3 000 rpm. Se tomó una porción del líquido y se filtró por una membrana hidrofílica de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro; luego, se tomaron 200  $\mu\text{l}$  de este filtrado y se colocó en un vial, adicionando 800  $\mu\text{l}$  de fase móvil A. El vial se llevó al vórtex por 3 min y se procedió a inyectar en el equipo. En el anexo 1 se muestra un esquema del método de análisis utilizado.

### 2.2.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La validación tuvo como finalidad asegurar la calidad de los resultados de los análisis, mediante el cumplimiento de los requisitos de la norma ISO/IEC 17 025 y del laboratorio de AGROCALIDAD.

Se calcularon los siguientes parámetros: límite de detección, límite de cuantificación, linealidad de la respuesta instrumental, precisión, incertidumbre, porcentaje de recuperación y especificidad.

Durante 5 días seguidos se preparó y se inyectó por triplicado una curva de calibración de cinco puntos más un blanco, todo en matriz. Del análisis estadístico de estos resultados se obtuvo el límite de detección, límite de cuantificación, linealidad de la respuesta instrumental, precisión y se estimó la incertidumbre del método.

### Límite de detección y cuantificación <sup>[33, 34]</sup>.

Para la obtención del límite de detección y cuantificación, se inyectaron 15 blancos de matriz y se calcularon las respectivas concentraciones para cada analito. El límite de detección se calculó sumando al promedio de las concentraciones obtenidas tres desviaciones estándar. El límite de cuantificación se calculó sumándole al promedio de las concentraciones obtenidas diez desviaciones estándar.

### Linealidad de la respuesta instrumental <sup>[33, 35]</sup>.

Se realizó en base a las curvas de calibración obtenidas de la validación. Se lo tiene que hacer con cada curva de calibración mediante la que se busque realizar una cuantificación. De no cumplir con los requisitos previamente determinados esta será descartada.

El criterio para el análisis de la linealidad de la respuesta instrumental es tomado de la legislación de la Dirección General de la Salud y Protección de los Consumidores de la Unión Europea DG – SANCO, documento SANCO/10684/2009, el cual cumple con la norma ISO/IEC 17 025, que determina que a través de la curva de calibración los residuales de la misma no deben ser nunca mayores al 20%.

El primer paso para cumplir con este estudio fue obtener la ecuación de la recta. Esto se realizó mediante la aplicación de mínimos cuadrados perfectos. Para esto, se obtuvo el promedio de las concentraciones teóricas ( $\bar{x}$ ) y de las respuestas instrumentales de cada concentración ( $\bar{y}$ ) y se aplicaron las ecuaciones 2.1 y 2.2.

$$Dxy = \sum_{i=1}^n ((x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})) \quad (2.1)$$

$$Dxx = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (2.2)$$

Para la obtención de la pendiente de la curva de calibración se dividió Dxy para Dxx según la ecuación 2.3.

$$b_{yx} = \frac{\sum_{i=1}^n ((x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}))}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (2.3)$$

Para la obtención de la ordenada al origen, se restó el promedio de la respuesta instrumental a la multiplicación de la pendiente de la recta por el promedio de la concentración teórica. Ecuación 2.4.

$$a_{yx} = \bar{y} - b_{yx} \times \bar{x} \quad (2.4)$$

Con la curva de calibración se obtuvo “y” calculada para cada punto. Ecuación 2.5

$$\hat{y} = a_{yx} + (b_{yx})(x) \quad (2.5)$$

Y por último, se obtuvieron los porcentajes de diferencia entre los valores de “y calculados” y de “y prácticos” los cuales no pueden ser mayores al 20%.

Precisión<sup>[33, 35]</sup>.

Para el estudio de la precisión del método, se determinaron la repetitividad y la precisión intermedia mediante un análisis simple de varianza. Los cálculos están basados en el método propuesto por el Instituto Ecuatoriano de Normalización Ecuatoriano. Los límites aceptados para la repetitividad y la precisión intermedia son basados en el documento SANCO/10684/2009 y criterios internos del laboratorio de AGROCALIDAD respectivamente.

Estimación de la incertidumbre<sup>[33, 34]</sup>.

Se determinó la incertidumbre combinada causada por la incertidumbre de variabilidad del método instrumental (uSR), del factor de respuesta instrumental (uFR), y de los estándares (uSE). Para obtener la incertidumbre por la variabilidad del método instrumental se aplicaron las siguientes fórmulas estadísticas:

$$SCB_B = \sum_{I=1}^K \sum_{J=1}^P (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 \quad (2.6)$$

$$SCB_w = \sum_{I=1}^K \sum_{J=1}^P (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 \quad (2.7)$$

$$DCM_B = \frac{SDC_B}{k - 1} \quad (2.8)$$

$$DCM_w = \frac{SDC_w}{n - k} \quad (2.9)$$

$$V_L = \frac{DCM_W - DCM_M}{p} \quad (2.10)$$

$$V_R = DCM_W + V_L \quad (2.13)$$

$$uSR = \sqrt{V_R} \quad (2.12)$$

Para la obtención de la incertidumbre en la respuesta instrumental, mediante la ecuación 2.13 se obtuvo la desviación típica residual y aplicando la formula 2.14 se consiguió la incertidumbre en la respuesta instrumental o uFR.

$$Sy, x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y})^2}{n - 2}} \quad (2.13)$$

$$uFR = \frac{Sy, x}{b_{yx}} \quad (2.14)$$

Para el cálculo de la incertidumbre de los estándares se aplicó la ecuación 2.15 en cada una de las diluciones realizadas.

$$u^2(nivel) = u^2(P) \cdot c^2(P) + u^2(V_p) \cdot c^2(V_p) + u^2(V_m) \cdot c^2(V_m) \quad 2.15$$

Finalmente, se obtuvo la incertidumbre del método mediante la raíz de la suma de los cuadrados de incertidumbre de variabilidad del método instrumental (uSR), del factor de respuesta instrumental (uFR), y de los estándares (uSE).

Porcentaje de recuperación <sup>[33, 34, 35]</sup>.

Para obtener el porcentaje de recuperación del método, se prepararon en tres días diferentes tres fortificaciones en brócoli. Las fortificaciones fueron analizadas exactamente como si se tratasen de muestras. Se utilizaron estándares certificados para este proceso. Se hizo un análisis de la linealidad de todas las curvas de calibración usadas para la cuantificación para comprobar su calidad. Se obtuvo el promedio de la recuperación en todas las fortificaciones y se obtuvo coeficiente de desviación estándar.

Cualificación de los analitos <sup>[35]</sup>.

En todo método analítico se busca que los resultados estén libres de falsos positivos, esto depende principalmente del tipo de detector que se utilice. En este estudio se utilizó un detector que no produce falsos positivos, dándonos seguridad sobre la identidad de la sustancia. Los parámetros tanto para la cualificación como para la cuantificación fueron tomados de la DG-SANCO.

Para la cualificación se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: tiempo de retención, presencia del ion padre, ion principal secundario y la relación de abundancia entre el ion principal y el secundario.

Como se observa en la Tabla 2.3, la variación máxima permitida del tiempo de retención del analito frente a estándares en matriz se estableció en  $\pm 2,5\%$  [1, 35].

**Tabla 2.3. Tiempos de retención para cada analito frente a estándares.**

Analito	Tiempo de retención del estándar (min)	Variación permitida [1, 35]	Rango permitido (min)	
			Mínimo	Máximo
Metomil	1,44	$\pm 2,5\%$	1,40	1,47
Carbofuran	2,76		2,69	2,83
Carbarilo	2,88		2,81	2,95
Profenofos	4,13		4,03	4,23

En la Tabla 2.4 se muestra la relación del ion principal y el ion secundario obtenido por medio de estándares en matriz, además del porcentaje de variación permitido según el documento SANCO/10684/2009.

**Tabla 2.4. Relación entre el ion principal y el secundario de cada analito.**

Analito	Relación entre el ion principal y secundario	Variación permitida	Rango permitido	
			Mínimo	Máximo
Metomil	1,473	$\pm 20$	1,1784	1,7676
Carbofuran	1,341	$\pm 20$	1,0728	1,6092
Carbarilo	5,779	$\pm 30$	4,0453	7,5127
Profenofos	2,179	$\pm 25$	1,63425	2,72375

Cuantificación de los analitos.

Para el análisis de las muestras se siguió el procedimiento de extracción y análisis validado descrito anteriormente. La masa tomada de la muestra se obtiene relacionando la masa total de la pasta y la del agua agregada a la muestra. El valor obtenido mediante la curva de

calibración debe ser multiplicado por un factor de dilución de 5 y corregido tomando en cuenta la masa tomada de la muestra. De existir más de una determinación se reportó el valor promedio de las mismas.

Con el fin de disminuir el efecto matriz y mejorar la exactitud en el análisis, las curvas de calibración fueron preparadas en extractos de la matriz en iguales condiciones que las muestras <sup>[1]</sup>.

### **2.3. DETERMINACIÓN DE PROFENOFOS, METOMIL, CARBOFURAN Y CARBARILO EN BRÓCOLI PROVENIENTE DEL MERCADO MAYORISTA DE QUITO.**

#### **2.3.1. TOMA DE MUESTRA**

Se realizó la toma de muestras de acuerdo con los protocolos de muestreo del Laboratorio de Calidad y Residuos de Plaguicidas e Insumos Agropecuarios de AGROCALIDAD. Se tomaron en total 30 muestras compuestas del principal mercado de la ciudad de Quito, el “Mercado Mayorista”, siendo éste del cual se surten otros mercados, puestos de expendio minoristas, restaurantes y público en general. Del total de muestras, 20 provenían de puestos de venta dentro dicho mercado y fueron codificadas con la letra “A” y las 10 restantes se tomaron de la venta al por mayor dentro dicho mercado. Para formar cada muestra compuesta se tomaron al azar 5 unidades de brócoli.

Las muestras fueron transportadas manteniéndolas bajo una cadena de frío, se homogenizaron y se tomó una sub muestra de cada muestra compuesta, a esta sub muestra se la denominó muestra de laboratorio.

### 2.3.2. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Las muestras de laboratorio fueron analizadas de acuerdo con el protocolo estandarizado en este trabajo. Se inyectaron blancos de matriz al inicio de cada set de muestras y blancos de solvente después de cada inyección, de esta manera, previniendo la aparición de falsos positivos en el primer caso y la disminución del “carry over” entre inyecciones en el segundo.

Se cualificó mediante la comparación del tiempo de retención del estándar con el de las muestras, luego se comparó la relación entre el ion principal y secundario del estándar, con la de las muestras. Esto se presenta en la en la Tabla 3.18, en la que se analiza el tiempo de retención de los picos hallados en las muestras, encontrando una variación máxima de 0,02 min respecto al tiempo de retención del estándar.

Mediante el uso de curvas de calibración se obtuvieron las concentraciones de cada analito. El límite de detección utilizado para el análisis de las muestras corresponde al obtenido de la validación redondeado al inmediato superior; mientras que el punto más bajo de la curva de calibración corresponde al límite de cuantificación.

## CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

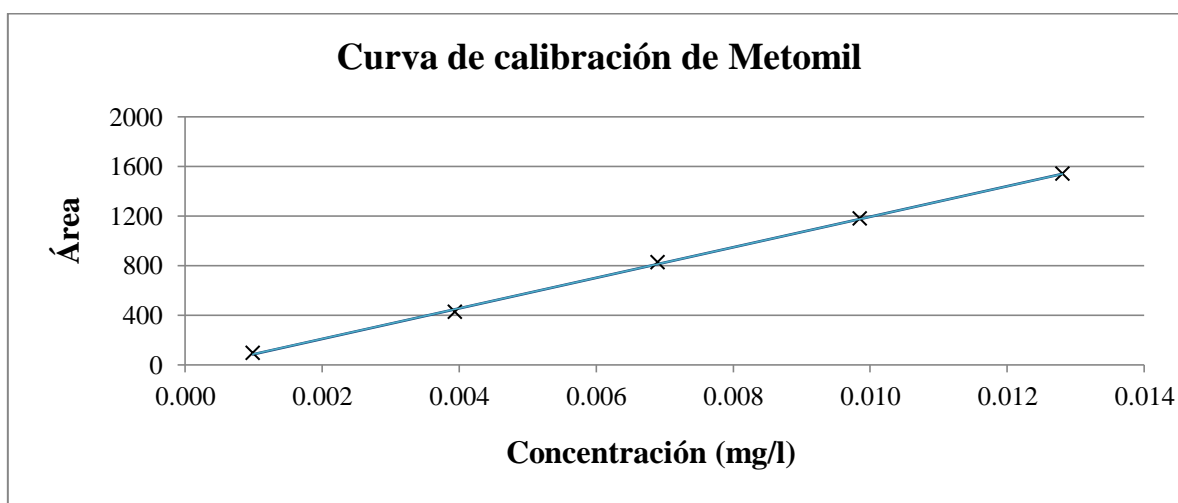
### 3.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

#### 3.1.1. CURVA DE CALIBRACIÓN

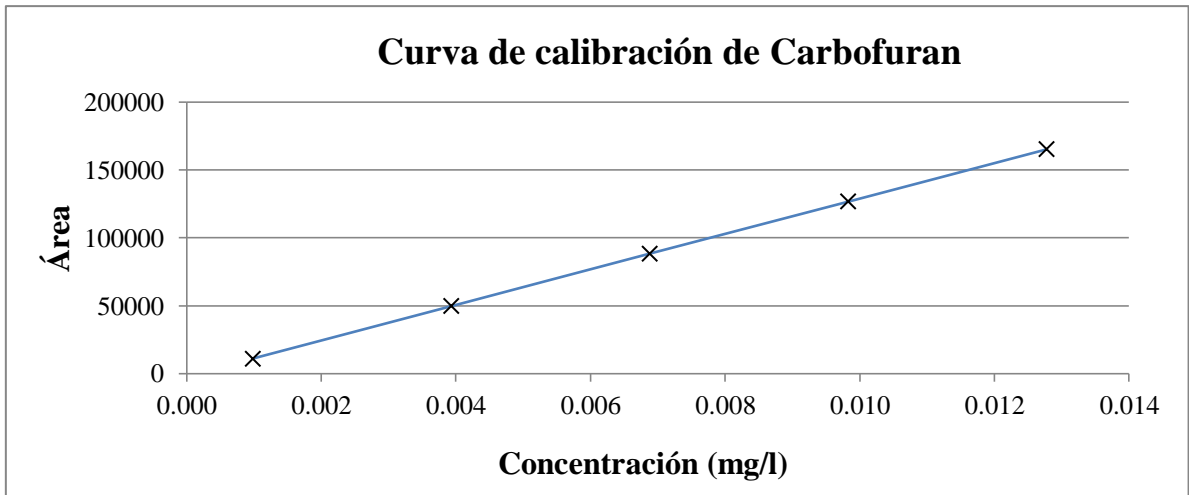
Se utilizó los mínimos cuadrados para efectuar de la curva de calibración. En el Anexo 2 se muestra el procedimiento seguido. En la Tabla 3.1 se presentan las ecuaciones de la recta para cada analito con su respectivo coeficiente de correlación. Se puede apreciar que existen coeficientes de correlación muy cercanos a 1 lo que indica la buena linealidad de las mismas. En las Figuras 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4 se presentan las curvas de calibración para cada analito.

**Tabla 3.1 Ecuaciones de la recta para cada analito.**

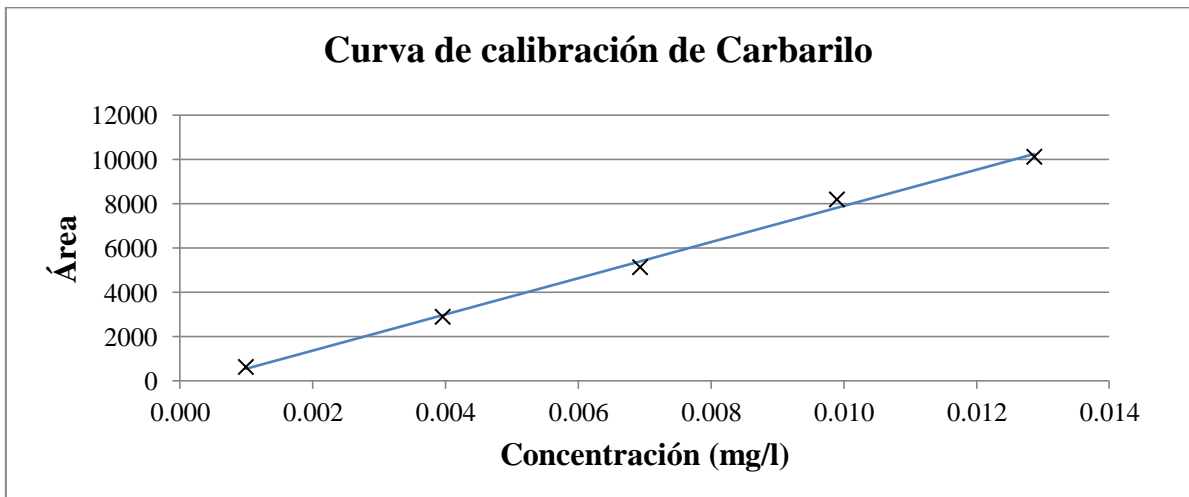
Plaguicidas	Ecuación de la Recta	Coefficiente de Correlación
Metomil	$y = 123299 x - 39$	$R^2 = 0,9995$
Carbofuran	$y = 13071281 x - 1753$	$R^2 = 1,0000$
Carbarilo	$y = 1025169 x - 265$	$R^2 = 0,9999$
Profenofos	$y = 6215136 x - 5223$	$R^2 = 0,9998$



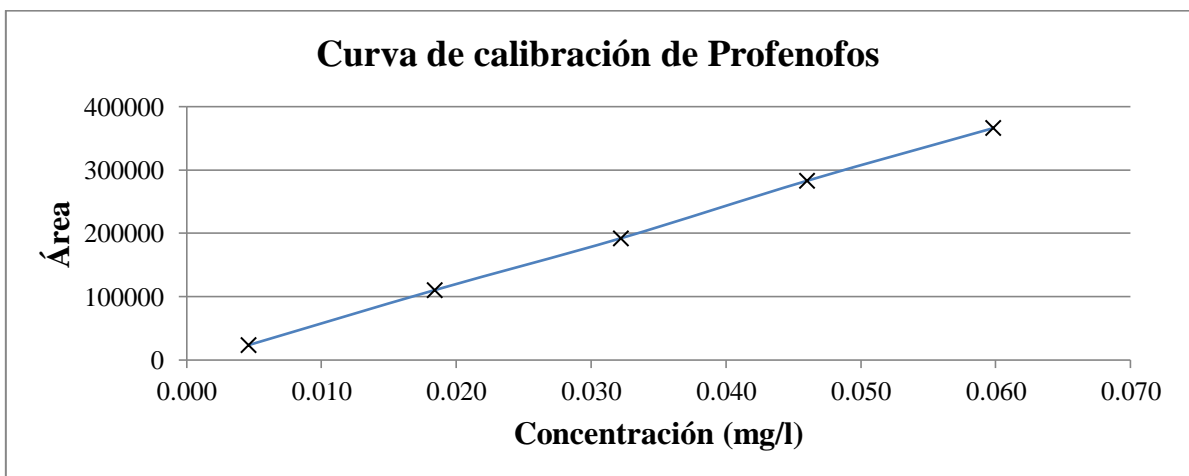
**Figura 3.1. Gráfica de la curva de calibración de Metomil.**



**Figura 3.2. Gráfica de la curva de calibración de Carbofuran.**



**Figura 3.3. Gráfica de la curva de calibración de Carbarilo.**



**Figura 3.4. Gráfica de la curva de calibración de Profenofos.**

### 3.1.2. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Los límites de detección y cuantificación para cada plaguicida analizado se presentan en la Tabla 3.2, siendo todos éstos inferiores a la mínima cantidad permitida por las legislaciones de Ecuador, Estados Unidos, la Unión Europea y Japón, demostrando que el método es aplicable para el propósito de verificar la inocuidad de brócoli para dichos plaguicidas tanto para el consumo interno como para la exportación.

**Tabla 3.2. Límites de detección y cuantificación para cada analito.**

	<b>Límite de Detección (mg/Kg)</b>	<b>Límite de Cuantificación (mg/Kg)</b>
Metomil	1,7E-03	1,8E-03
Carbofuran	7,4E-04	7,7E-04
Carbarilo	1,5E-03	1,9E-03
Profenofos	4,5E-03	4,8E-03

Los bajos límites de cuantificación y cualificación se explican por la metodología de limpieza del extracto y el uso de la espectrometría de masas en tándem.

El proceso de limpieza del extracto mediante PSA y C18 más la dilución por un factor de 5 del mismo, disminuyeron considerablemente los niveles de coextractantes. El analizador de masas en tándem, drásticamente redujo el ruido al filtrar mediante dos cuadrupolos los iones que no corresponden a los compuestos que nos son de interés, lo que, en otras palabras, garantizó que solo los iones provenientes del analito lleguen al detector.

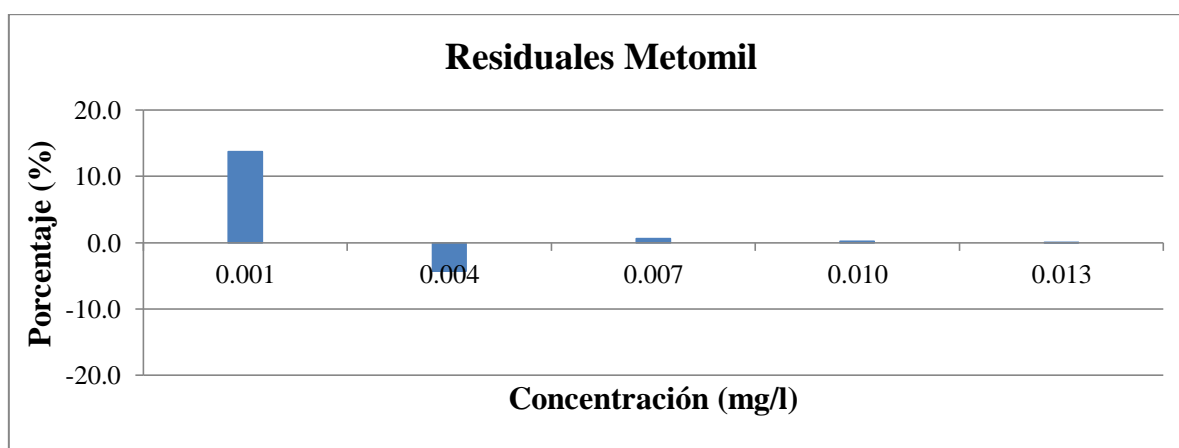
### 3.1.3. LINEALIDAD DE LA RESPUESTA

A continuación, en la Tabla 3.3, se muestran los resultados del estudio de la linealidad instrumental para cada analito, los cuales no sobrepasan el límite máximo del porcentaje de residuales establecido que es del 20 %. En ella se puede apreciar que existe una tendencia a que exista mayor error en los niveles bajos de la curva.

**Tabla 3.3. Porcentaje de residuales de la curva de calibración promedio.**

	<b>Nivel</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Metomil	%	11,3	-4,7	1,5	0,1	-0,1
Carbofuran	%	-0,6	0	0,2	0	0
Carbarilo	%	4,3	-1,8	0,2	0,5	-0,2
Profenofos	%	0,2	1,0	-1,4	0,8	-0,1

Con el fin de facilitar la apreciación del porcentaje de residuales en cada curva de calibración se realizó las gráficas respectivas para cada analito.



**Figura 3.5. Gráfica de los residuales de la curva de calibración de Metomil.**

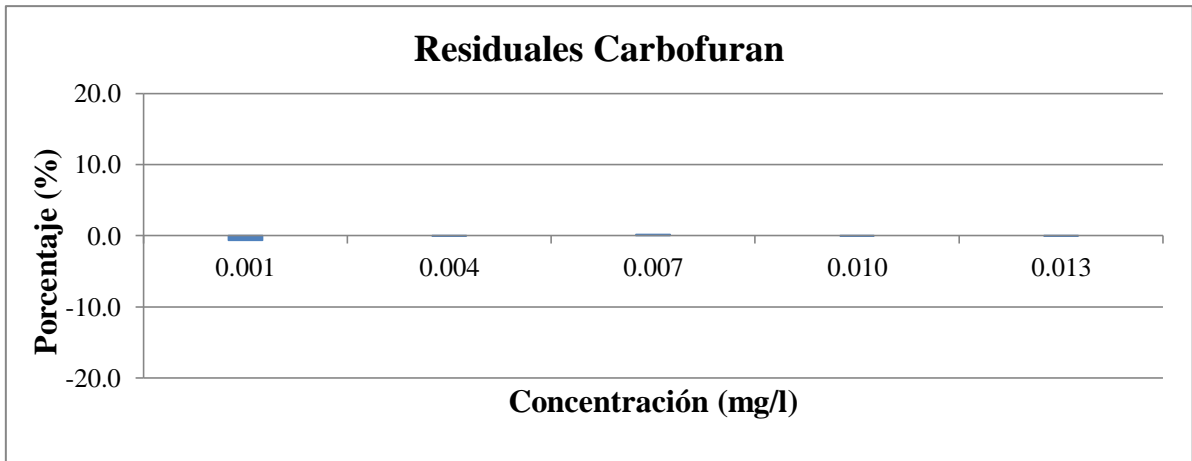


Figura 3.6. Gráfica de los residuales de la curva de calibración de Carbofuran.

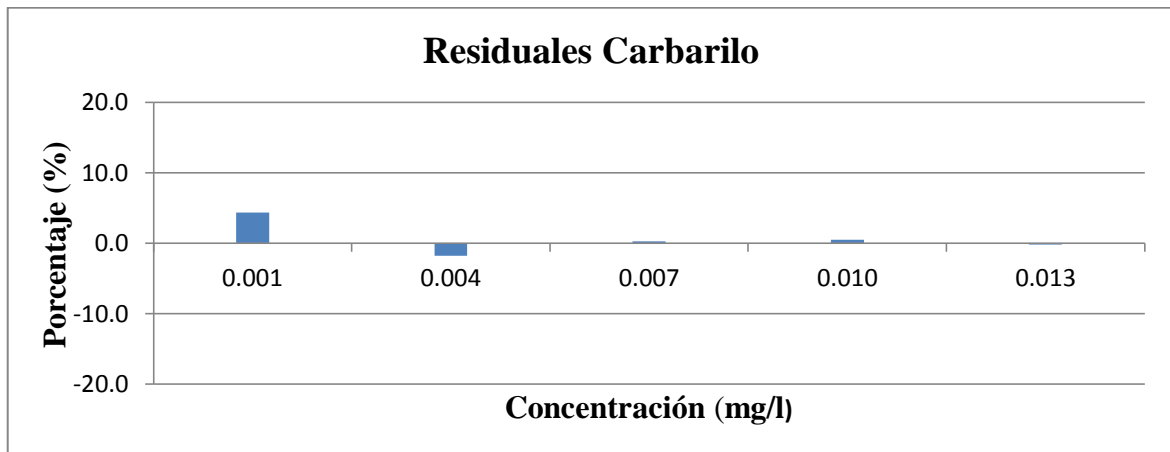


Figura 3.7. Gráfica de los residuales de la curva de calibración de Carbarilo.

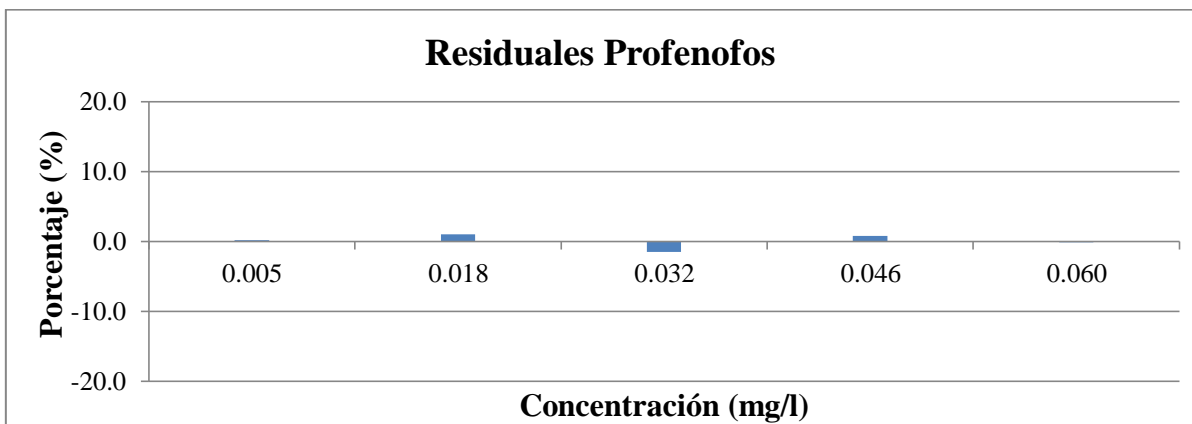


Figura 3.8. Gráfica de los residuales de la curva de calibración de Profenofos.

Se debe aclarar que en este estudio se hizo análisis punto por punto de la curva, que es un mecanismo más apto para el análisis de ultra trazas en contraposición con realizar un estudio de todo el intervalo, como sería el caso aplicando el cuadrado del coeficiente de

correlación. Mediante el análisis punto por punto se obtiene más información que puede llevar a determinar cuál o cuáles son los puntos que presentan algún problema para tomar decisiones más apropiadas.

### 3.1.4. PRECISIÓN

Para el estudio de la precisión, se calcularon las concentraciones utilizando los datos de la validación mediante la curva de calibración promedio. Estas concentraciones se muestran en el Anexo 3.

Mediante un análisis simple de varianza se obtienen los datos de las Tablas 3.4 a la 3.7. En ellas se observa que ninguno de los datos obtenidos sobrepasa el límite máximo establecido de 20%. Cabe destacar que existen otros criterios para la aceptación o rechazo de estas medidas, una de las más utilizadas es la ecuación de Horwits de la cual se obtendrían rangos aún mayores como se puede observar en cada tabla, lo que demuestra la conformidad de los resultados obtenidos en la validación.

**Tabla 3.4. Resultados del cálculo de la precisión para Metomil.**

Nivel	Repetitividad		Precisión Intermedia		Límite máximo aceptado	Límite máximo de referencia (ecuación de Horwits)
	Sr	%CVr	SR	%CVR	%	%
1	1,3E-04	13,7	1,9E-04	19,8	20	45
2	7,8E-04	19,8	4,9E-04	12,5	20	37
3	9,2E-04	13,3	1,0E-03	14,7	20	34
4	1,7E-03	16,8	1,4E-03	14,1	20	32
5	2,5E-03	19,6	1,9E-03	14,5	20	31

**Tabla 3.5. Resultados del cálculo de la precisión para Carbofuran.**

Nivel	Repetitividad		Precisión Intermedia		Límite máximo aceptado	Límite máximo de referencia (ecuación de Horwits)
	Sr	% CVr	SR	% CVR	%	%
1	5,3E-05	5,4	1,9E-04	19,1	20	45
2	4,1E-04	10,4	4,4E-04	11,3	20	37
3	5,2E-04	7,5	1,1E-03	15,6	20	34
4	1,2E-03	12,1	1,2E-03	12,4	20	32
5	9,5E-04	7,5	1,5E-03	11,7	20	31

**Tabla 3.6. Resultados del cálculo de la precisión para Carbarilo.**

Nivel	Repetitividad		Precisión Intermedia		Límite máximo aceptado	Límite máximo de referencia (ecuación de Horwits)
	Sr	% CVr	SR	% CVR	%	%
1	1,4E-04	14,3	1,8E-04	17,8	20	45
2	6,8E-04	17,2	5,2E-04	13,2	20	37
3	6,4E-04	9,2	1,1E-03	16,2	20	34
4	8,8E-04	8,9	1,4E-03	13,8	20	32
5	1,1E-03	8,2	1,7E-03	13,3	20	31

**Tabla 3.7. Resultados del cálculo de la precisión para Profenofos.**

Nivel	Repetitividad		Precisión Intermedia		Límite máximo aceptado	Límite máximo de referencia (ecuación de Horwits)
	Sr	%CVr	SR	%CVR	%	%
1	3,9E-04	8,5	6,2E-04	13,5	20	36
2	2,1E-03	11,5	2,0E-03	10,8	20	29
3	2,6E-03	8,2	2,9E-03	9,0	20	27
4	3,0E-03	6,5	3,5E-03	7,5	20	25
5	7,3E-03	12,2	5,5E-03	9,2	20	24

### 3.1.5. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE

En las Tablas 3.8 a la 3.11 se muestran los resultados de los cálculos de la incertidumbre de variabilidad del método instrumental ( $\mu\text{SR}$ ), el factor de respuesta instrumental ( $\mu\text{FR}$ ), y de los estándares ( $\mu\text{SE}$ ) además de la incertidumbre combinada de todas estas.

**Tabla 3.8. Resultados del cálculo de incertidumbre para Metomil.**

	Nivel				
	1	2	3	4	5
$\mu\text{FR}$	0,00014				
$\mu\text{SR}$	0,00022	0,00041	0,00038	0,00086	0,00151
$\mu\text{SE}$	0,00006	0,00025	0,00044	0,00063	0,00081
<b>U</b>	0,00023	0,00048	0,00058	0,00107	0,00171

**Tabla 3.9. Resultados del cálculo de la incertidumbre para Carbofuran.**

	Nivel				
	1	2	3	4	5
$\mu\text{FR}$	0,00002				
$\mu\text{SR}$	0,00024	0,00012	0,00021	0,00108	0,00035
$\mu\text{SE}$	0,00006	0,00025	0,00044	0,00062	0,00081
<b>U</b>	0,00025	0,00028	0,00049	0,00125	0,00088

**Tabla 3.10. Resultados del cálculo de la incertidumbre para Carbarilo.**

	Nivel				
	1	2	3	4	5
$\mu\text{FR}$	0,00006				
$\mu\text{SR}$	0,00021	0,00022	0,00027	0,00103	0,00040
$\mu\text{SE}$	0,00006	0,00025	0,00044	0,00063	0,00082
<b>U</b>	0,00022	0,00033	0,00052	0,00121	0,00091

**Tabla 3.11. Resultados del cálculo de la incertidumbre para Profenofos.**

	Nivel				
	1	2	3	4	5
$\mu_{FR}$	0,00061				
$\mu_{SR}$	0,00061	0,00182	0,00183	0,00191	0,00594
$\mu_{SE}$	0,00004	0,00014	0,00025	0,00035	0,00046
<b>U</b>	0,00086	0,00192	0,00194	0,00204	0,00599

### 3.1.6. PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN

En la tabla 3.12 se presentan las curvas de calibración que se usaron para la cuantificación de los analitos en el estudio de porcentaje de recuperación.

**Tabla 3.12. Curvas de calibración utilizadas para el estudio de la recuperación con los errores porcentuales de los residuales.**

Día	Ecuación de la Recta	Puntos de la curva de calibración				
		1	2	3	4	5
Metomil						
1	$y = 119308x - 46$	13,2	-3,1	0,3	-0,2	0,3
2	$y = 141450x - 31$	9,6	-9,1	3,7	2,4	-1,7
3	$y = 99231x - 31$	5,8	-3,8	0,5	2,0	-1,0
Carbofuran						
1	$y = 13378183x - 2630$	-4,0	1,6	-0,6	0,2	-0,1
2	$y = 13071281x - 1753$	-4,3	-3,3	4,0	0,2	-0,9
3	$y = 10909357x - 2194$	10,0	1,2	-6,3	3,8	-0,6
Carbarilo						
1	$y = 1065300x - 367$	10,0	-1,1	-1,1	0,6	0,1
2	$y = 1194658x - 169$	-1,0	-4,4	3,3	0,8	-1,0
3	$y = 824525x - 271$	15,5	-1,7	-4,5	3,8	-0,9
Profenofos						
1	$y = 5672183x - 4766$	2,9	1,4	-0,1	-2,4	1,3
2	$y = 6347751x - 1077$	-6,1	-4,9	2,7	4,5	-2,9
3	$y = 5894872x - 5931$	15,7	1,1	-6,7	3,0	0,0

En la Tabla 3.13, se muestran los resúmenes de los resultados obtenidos del estudio del porcentaje de recuperación, además se comparan el criterio de la Unión Europea. El porcentaje de recuperación promedio del método fue del 95%. Este dato es congruente con los reportados por la literatura para el método multiresiduos QUECHERS con un promedio del porcentaje de recuperación para 167 plaguicidas del 95% <sup>[4]</sup> y un rango del 90% al 110% de recuperación, según la bibliografía, para los cuatro plaguicidas analizados en este estudio <sup>[39]</sup>.

**Tabla 3.13. Porcentaje de recuperación promedio.**

Analito	Recuperación promedio (%)	RSD (%)	Criterio de la Unión Europea <sup>[35]</sup>	
			Recuperación promedio (%)	RSD (%)
Metomil	97	12,7	70 - 120	≤ 20
Carbofuran	91	8,8		
Carbarilo	92	10,5		
Profenofos	100	10,3		

### 3.2. CUALIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

#### 3.2.1. CUALIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

En la Tabla 3.14 se presentan las curvas de calibración usadas para este análisis y los criterios de aceptación. En ella se observa que todas las curvas cumplen con los requisitos previos. En el Anexo 4 se muestra más ampliamente los datos y resultados de las muestras analizadas de brócoli.

**Tabla 3.14. Ecuaciones utilizadas para la cuantificación de los distintos analitos en las muestras.**

Plaguicidas	Ecuación de la Recta	Punto					Límite máximo aceptado <sup>[35]</sup> (%)
		1	2	3	4	5	
Metomil	$y = 94172x - 34$	18,9	-6,0	0,7	0,8	-0,2	20
Carbofuran	$y = 10688297x - 1611$	4,4	2,8	-5,7	3,2	-0,5	20
Carbarilo	$y = 817268x - 262$	16,8	-2,5	-4,8	4,9	-1,3	20
Profenofos	$y = 5897102x - 6458$	17,0	0,3	-6,9	3,9	-0,4	20

**Tabla 3.15. Tiempos de retención de cada analito<sup>1</sup> frente a estándares.**

Código de la muestra	Resultado (minutos)	Rango permitido <sup>[35]</sup> (minutos)	
		Mínimo	Máximo
<b>Metomil</b>			
2A	1,44	1,40	1,47
2A	1,44		
4A	1,44		
4A	1,44		
4Ar	1,44		
4Ar	1,46		
5A	1,44		
5A	1,44		
6A	1,44		
6A	1,44		
8A	1,43		
8A	1,43		
11A	1,43		
11A	1,43		
<b>Profenofos</b>			
8A	4,13	4,03	4,23
8A	4,13		
11A	4,13		
11A	4,13		

<sup>1</sup>Se encontraron residuos de plaguicidas en seis de las treinta muestras analizadas; éstos fueron metomil y profenofos.

Luego de esto los picos se integraron y se calculó la relación entre el ion principal y el secundario la cual se muestra en la Tabla 3.16.

**Tabla 3.16. Relación entre el ion principal y secundario de las muestras.**

Código de las muestra	Resultado	Rango permitido <sup>[35]</sup>	
		Mínimo	Máximo
<b>Metomil</b>			
2A	1,48	1,18	1,77
2A	1,53		
4A	1,55		
4A	1,58		
4Ar	1,69		
4Ar	1,62		
5A	1,66		
5A	1,51		
6A	1,74		
6A	1,19		
8A	1,54		
8A	1,52		
11A	1,51		
11A	1,52		
<b>Profenofos</b>			
8A	2,18	1,63	2,72
8A	2,16		
11A	2,23		
11A	2,20		

Al igual que los tiempos de retención, la relación entre el ion principal y secundario de cada plaguicida encontrado está dentro del rango permitido. Con estos requisitos cumplidos podemos asegurar de manera inequívoca la identidad de los analitos.

### 3.2.2. CUANTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los límites de cuantificación y detección aplicados para el análisis se muestran en la Tabla 3.17.

**Tabla 3.17. Límites de detección y cuantificación para cada analito.**

<b>Analito</b>	<b>Límite de Detección (mg/Kg)</b>	<b>Límite de Cuantificación (mg/Kg)</b>
Metomil	0,002	0,005
Carbofuran	0,001	0,005
Carbarilo	0,002	0,005
Profenofos	0,005	0,023

Luego de la cuantificación y posterior comparación con los límites, se encontró que seis de las treinta muestras analizadas contienen residuos de alguno de los plaguicidas analizados.

De éstas, la muestra 4A tuvo una cantidad de residuos de profenofos que excedió del rango de trabajo de la curva de calibración, por lo que se procedió a re-analizarla esta vez tomando una porción menor de muestra.

Al segundo resultado de esta muestra, esta vez sí dentro del rango de la curva de calibración, se le codificó como 4Ar, y se lo utilizó como resultado de la muestra 4A. Los plaguicidas encontrados fueron metomil en seis muestras, y profenofos en dos. La Tabla 3.18 muestra el resumen de los resultados.

**Tabla 3.18. Resultados de los análisis de las muestras de brócoli.**

Código de la muestra	Concentración (mg/Kg)			
	Metomil	Carbofuran	Carbarilo	Profenofos
BLANCO	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
1A	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
2A	0,057	<L.D.	<L.D.	<L.D.
3A	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
4Ar	0,185	<L.D.	<L.D.	<L.D.
5A	0,010	<L.D.	<L.D.	<L.D.
6A	<L.C.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
7A	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
8A	0,053	<L.D.	<L.D.	0,107
9A	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
10A	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
11A	0,014	<L.D.	<L.D.	0,033
12A	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
13A	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
14A	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
15A	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
16A	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
17A	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
18A	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
19A	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
20A	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
1B	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
2B	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
3B	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
4B	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
5B	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
6B	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
7B	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
8B	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
9B	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
10B	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.

El siguiente paso del proceso fue comparar las cantidades de residuos de cada muestra con la legislación ecuatoriana la cual se sujeta al *Codex-Alimentarius*, de la Unión Europea, de Estados Unidos y Japón.

En la Tabla 3.19 se muestra un resumen de estas legislaciones.

**Tabla 3.19. Resumen de las legislaciones tomadas en cuenta en este trabajo.**

<b>Límites máximos permitidos (mg/Kg)</b>				
	<b>Ecuador</b>	<b>FAS</b>	<b>DG-SANCO</b>	<b>JFCRF</b>
Metomil	No permitido	2	0,020	2,000
Carbofuran	No permitido	-	0,020	0,500
Carbarilo	No permitido	10	0,050	6,000
Profenofos	No permitido	-	0,050	0,050

En las Tablas 3.20, 3.21 y 3.22 se muestra la comparación de los resultados con distintas legislaciones. De las seis muestras con residuos de algún plaguicida ninguna cumple con la legislación ecuatoriana debido a que ésta, basada en el *Codex-Alimentarius*, no permite el uso de metomil o profenofos en cultivos de brócoli. Tres de ellas incumplen la normativa de la Unión Europea, en uno de los casos inclusive la residualidad de metomil es el 92% del valor máximo permitido. Una muestra incumple la normativa de Japón y ninguna incumple las normativas de Estados Unidos.

**Tabla 3.20. Muestras que incumplen con la legislación del Ecuador.**

<b>Legislación ecuatoriana (<i>Codex-Alimentarius</i>) (mg/Kg)</b>		
<b>Código de la muestra</b>	<b>Metomil</b>	
2A	0,057	No permitido
4A	0,185	
5A	0,010	
6A	<L.C.	
8A	0,053	
11A	0,014	
<b>Código de la muestra</b>	<b>Profenofos</b>	
8A	0,107	No permitido
11A	0,033	

**Tabla 3.21. Muestras que incumplen con la legislación de la Unión Europea.**

<b>Legislación de la Unión Europea (mg/Kg)</b>		
<b>Código de la muestra</b>	<b>Metomil</b>	
2A	0,057	0,020
4A	0,185	
8A	0,053	
<b>Código de la muestra</b>	<b>Profenofos</b>	
8A	0,107	0,050

**Tabla 3.22. Muestras que incumplen la legislación del Japón.**

<b>Legislación de la Japón (mg/Kg)</b>		
<b>Código de la muestra</b>	<b>Profenofos</b>	
8 <sup>a</sup>	0,107	0,050

La presencia de profenofos en brócoli no solo se ha encontrado en el presente estudio, en el año 2000 se encontraron residuos de profenofos en muestras de brócoli en Holanda a un nivel de 0,040 mg/Kg, lo que indica que incluso en la Unión Europea, a pesar de todos sus controles y tecnologías implementadas en la agricultura, es posible que se presenten casos de residualidad de plaguicidas. Además, residuos de profenofos en pimienta importada son comúnmente encontrados en Holanda <sup>[40]</sup>.

La FDA en un informe del año 2006 indica que en el 64,4% de vegetales de producción interna tenían residuos de plaguicidas y el 1,4% contenían residuos de plaguicidas superiores a la norma <sup>[41]</sup>. Lo que demuestra una vez más que la problemática de la contaminación de vegetales por plaguicidas es un problema global.

## **CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

Se estandarizó un método analítico para la determinación de residuos de metomil, carbofuran, carbarilo y profenofos en brócoli utilizando como técnica extractiva el método de QuEChERS y como técnica instrumental la cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas tándem.

El método analítico fue validado según los criterios de la norma DG – SANCO, documento SANCO/10684/2009, y del laboratorio de AGROCALIDAD los cuales tienen conformidad con la norma ISO/IEC 17 025, cumpliendo este con todos los requisitos impuestos, asegurando la calidad de sus resultados.

Los límites de cuantificación para metomil, carbofuran, carbarilo y profenofos en brócoli son muy inferiores a los límites máximos permisibles normados de las legislaciones tomadas en cuenta en este estudio, lo que nos asegura la conformidad con dichas legislaciones.

Los resultados demostraron la presencia de profenofos y metomil en brócoli y plantean la urgente necesidad de aplicar programas de monitoreo de plaguicidas para evitar que este tipo de productos contaminados lleguen al consumidor, además de representar un posible cierre de mercados si estos productos fueran exportados a la Unión Europea o Japón.

Se encontraron en seis de treinta muestras residuos de plaguicidas no permitidos en brócoli según la legislación ecuatoriana. De estas muestras tres no hubiesen podido ingresar a la Unión Europea y una a Japón.

Se recomienda realizar estudios de residualidad a largo plazo en toda la cadena de producción de brócoli para determinar si estos niveles de contaminación están normalmente presentes en él y cuál es la fuente exacta de los mismos.

Se recomienda también a los productores de brócoli utilizar plantas de tratamiento de agua para el riego de sus cultivos con el fin de prevenir posibles contaminaciones cruzadas. Al público en general, se recomienda lavar con abundante agua el brócoli antes de consumirlo ya que muchos plaguicidas, como los carbamatos, son afines al agua.

## CAPÍTULO V: BIBLIOGRAFÍA

1. Wang, J., Chow W., Leung, D. (2010). Applications of LC/ESI-MS/MS and UHPLC QqTOF MS for the determination of 148 pesticides in fruits and vegetables. *Anal Bioanal Chem*, 396, pp. 1513 – 1517.
2. Sack, C., Smoker, M., Chamkasem, N., Thompson, R., Satterfield, G., Masse, C., Mercer, G., Neuhaus, B., Cassias, I., Chang, E., Lin, Y., MacMahon, S., Wong, J., Zhang, K., y Smith, R. (2011). Collaborative Validation of the QuEChERS Procedure for the Determination of Pesticides in Food by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, pp. 6383 – 6386.
3. Alder, L., Greulinch K., Kempe, G., Vieth B. (2006). Residue Analysis of 500 High Priority Pesticides: Better by GC-MS or LC- MS/MS. *Mass Spectrometry Reviews*, 25, pp. 859 – 860.
4. Wong, J., Zhang, K., Tech, K., Hayward, D., Makovi, C., Krynitsky, A., Schenck, F., Banerjee, K., Dasgupta, S., y Brown, D. (2010). Multiresidue Pesticide Analysis in Fres Produce by Capillary Gas Chromatography – Mass Spectrometry/Selective Ion Monitoring (GC-MS/SIM) and – Tandem Mass Spectrometry (GC-MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, pp. 5868, 5869.
5. Revelo, R., Ruiz, M., Oña X. (2009). *Perfil de Brócoli*, Centro de Información e Inteligencia Comercial - CICO de CORPEI, Quito, Ecuador, pp. 3, 4.

6. Holden, J., Broccoli, stalks, raw, USDA, 2010.
7. Arikawa, A. Y. (2006). *Cruciferous Vegetables, Secondary Metabolites of Glucosinolates and Colon Cancer Risk in Rats*, University of Minnesota, Estados Unidos.
8. Topè, A., Rogers, P. (2009). Evaluation of protective effects of sulforaphane on DNA damage caused by exposure to low levels of pesticide mixture using comet assay. *Journal of Environmental Science and Health*, 44, pp. 657, 658.
9. UC Vegetable Research and Information Center, (2010). *Broccoli production in California*. California, Estados Unidos.
10. República del Ecuador. (1999-2000). *III Censo Nacional Agropecuario, Volumen I*. Ecuador.
11. Zumárraga, H. (2011). *Selección de dos productos agrícolas de exportación importantes desde el punto de vista económico, social y sanitario para el país*, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), Ecuador.
12. Reyes, V. (2009). *Ciclo biológico y cría de (Aphidius colemani) parasitoide de adultos del pulgón harinoso (Brevicoryne brassicae), plaga de brocoli*. Tesis de Ingeniería Agronómica, Facultad de Recursos Naturales, Escuela de Ingeniería Agronómica, Escuela Politécnica Superior del Chimborazo (ESPOCH), Riobamba, Ecuador.

13. Tadeo, J. (2008). *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples*, 1ª edición, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL., Estados Unidos.
14. British Crop Protection Council, (2000). *The Pesticide Manual*, 12ª edición, Reino Unido.
15. Maštovská, K., Dorweiler, K., Lehotay, S., Wegscheid, J., y Szpylka K. (2010). Pesticide Multiresidue Analysis in Cereal Grains Using Modified QuEChERS Method Combined with Automated Direct Sample Introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, pp. 5959, 5960.
16. Instituto Nacional de Ecología, INE, (s.f.), *Sistema de consulta de plaguicidas-Carbofuran*. México.
17. Instituto Nacional de Ecología, INE, (s.f.), *Sistema de consulta de plaguicidas-Carbarilo*. México.
18. Food and Agriculture Organization, FAO, (2007). *Specifications and evaluations for agricultural pesticides, Carbaryl*, Estados Unidos.
19. Residuos de plaguicidas en los alimentos y piensos, *Codex-Alimentarius*, 2011.
20. Foreign Agricultural Service, FAS, (2011). *International Maximum Residue Level Database*, Estados Unidos.

21. Comisión Europea, (2012). *Pesticide Residues MRLs*, Europa.
22. The Japan Food Chemical Research Foundations, *Table of MRLs for Agricultural Chemicals*, Japón.
23. Shi. X., Jin. F., Huang. Y., Du. X., Li C., Wang. M., Shao. H., Jin. M., Wang J. (2011). Simultaneous determination of five plant growth regulators in fruits by Modified Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, pp. 60 – 63.
24. Lehotay, S. (2011). QuEChERS Sample Preparation Approach for Mass Spectrometric Analysis of Pesticide Residues in Foods. *Mass Spectrometry in Food Safety*, 747, pp. 65.
25. Waters Corporation, *DisQuE Dispersive Sample Preparation Frequently Asked Questions*, Massachusetts, Estados Unidos.
26. Skoog, D., Crouch, S., Holler, J. (2008). *Principios de Análisis Instrumental*. Sexta Edición, Cengage Learning, Mexico, pp. 785-800.
27. Grimalt, S. (2009). *Nuevas aportaciones de LC-MS con analizadores de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo en el análisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en alimentos de origen vegetal*. Tesis Doctoral, Instituto Universitario

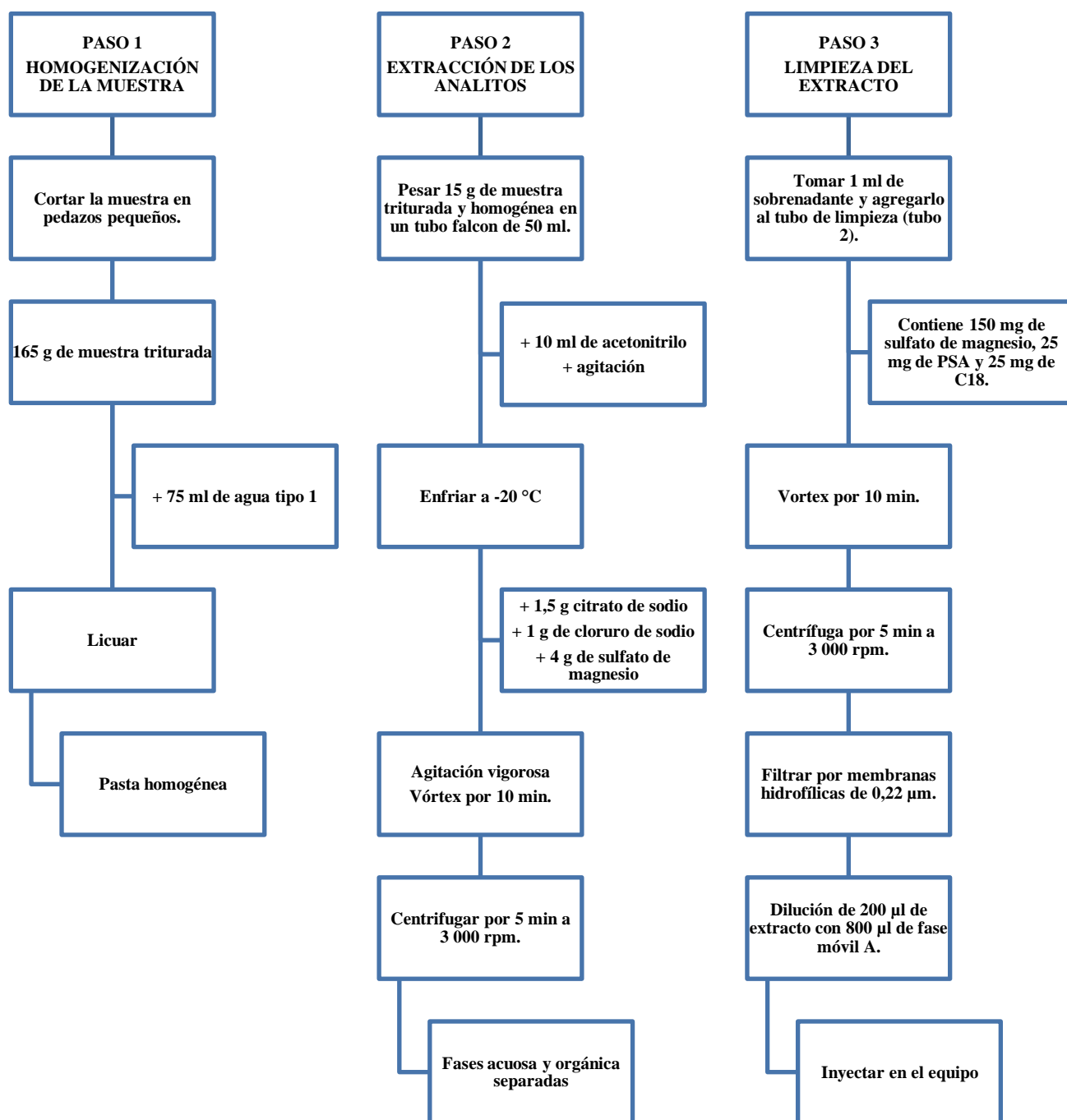
- de Plaguicidas y Aguas, Universitat Jaume I, Castellón de la Plana, España, pp. 19 - 37.
28. Nováková, Lucie, Matysová, Ludmila, Solich Petr. (2005). *Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis*, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, República Checa.
  29. Waters Corporation. (2010). *Xevo-TQS Mass Spectrometry System, Operator's Overview and Maintenance Guide*, Massachusetts, Estados Unidos.
  30. Walorczyk S., Drożdżyński. D. (2011). Development and Validation of a Routine Multiresidue Method for Determining 140 Pesticides in Fruits and Vegetables by Gas Chromatography/Tandem Quadrupole Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International*, 94, pp. 1625, 1635, 1637.
  31. Kovalczuk, T., Lacina, O, Jech, M., Poustka. J., Hajslová. J. (2008). Novel approach to fast determination of multiple pesticide residues using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Food Additives and Contaminants*, 25, pp. 444, 446, 447.
  32. Organización Internacional de Normalización y Comisión Electrotécnica Internacional, ISO/IEC 17025 (2005). *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración*.

33. Instituto Nacional de Normalización, INEN, (2010). *Validación de métodos analíticos*, Quito, Ecuador.
34. ASECAL INTERNACIONAL, (2010), *Validación y cálculo de Incertidumbre de Métodos de ensayo*, Quito, Ecuador.
35. Dirección general de la salud y protección de los consumidores DG- SANCO, (2010). *Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residue Analysis in Food and Feed*.
36. AOAC INTERNATIONAL, (2010). *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*, Horwitz, W. y Latimer, G., 18<sup>a</sup> edition, Gaithersbur, MD, Estados Unidos.
37. Ortelli, D., Edder, P., y Corvi, C. (2004). Multiresidue analysis of 74 pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 520, pp. 33 – 35.
38. Waters Corporation (2010), *Troubleshooting Carryover*, Massachusetts, Estados Unidos.
39. Lehotay S., De Kok, A., Hiemstra M., Van Bodegraven P. (2005). Validation of a fast and easy method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. En: *Journal of AOAC International*, 88, pp. 605

40. Inspectorate of Health Protection, Commodities and Veterinary Public Health. Food Inspection Service. (2001). *Report of Pesticide Residue Monitoring Results*, Amsterdam, Países Bajos.
  
41. Food and Drugs Administration, FDA. (2011). *Pesticide Residue Monitoring Program Results and Discussion FY 2005*, Estados Unidos.

## **ANEXOS**

## Anexo 1: Esquema del método de análisis.



**Anexo 2: Cálculo de la curva de calibración mediante la aplicación de los mínimos cuadrados <sup>[25]</sup>.**

En la Tabla A2.1 se muestran los datos promedio de la curva de Carbofuran que serán usados para el ejemplo.

**Tabla A2.1. Curva de calibración promedio de carbofuran.**

<b>x (mg/l)</b>	<b>y (Área)</b>
0,001	11027
0,004	49628
0,007	88378
0,01	126681
0,013	165237

Aplicando el procedimiento y las fórmulas detalladas en el capítulo 2 se obtiene los siguientes resultados:

$$\bar{x} = \frac{0,001 + 0,004 + 0,007 + 0,010 + 0,013}{5} = 0,01$$

$$\bar{y} = \frac{11027 + 49628 + 88378 + 126681 + 165237}{5} = 88190$$

$$\begin{aligned} Dxy = & ((0,001 - 0,01)(11027 - 88190) + (0,004 - 0,01)(49628 - 88190) \\ & + (0,007 - 0,01)(88378 - 88190) + (0,010 - 0,01)(126681 - 88190) \\ & + (0,013 - 0,01)(165237 - 88190) = 1137 \end{aligned}$$

$$D_{xx} = (0,001 - 0,01)^2 + (0,004 - 0,01)^2 + (0,007 - 0,01)^2 + (0,007 - 0,01)^2 \\ + (0,013 - 0,01)^2 = 8,7 \times 10^{-5}$$

Para la obtención de la pendiente de la curva de calibración se divide  $D_{xy}$  y  $D_{xx}$  según la ecuación 2.3.

$$b_{yx} = \frac{1137}{8,7 \times 10^{-5}} = 13\,071\,281$$

Para la obtención de la ordenada, al origen se resta el promedio de la respuesta instrumental a la multiplicación de la pendiente de la recta por el promedio de la concentración teórica.

$$a_{yx} = 88190 - 13\,017\,281 \times 0,01 = -1753$$

Teniendo como resultado la correspondiente ecuación de la recta.

$$y = 13\,071\,281 x - 1\,753$$

**Anexo 3: Concentraciones obtenidas de los datos de la validación al aplicar la curva de calibración.**

**Tabla A3.1. Concentraciones calculadas mediante la curva de calibración de Metomil.**

Día	Inyección	Nivel				
		1	2	3	4	5
1	1	0,001	0,004	0,008	0,011	0,015
	2	0,001	0,004	0,008	0,011	0,014
	3	0,001	0,004	0,008	0,011	0,015
	Promedio	0,001	0,004	0,008	0,011	0,015
2	1	0,001	0,004	0,007	0,010	0,014
	2	0,001	0,004	0,007	0,009	0,014
	3	0,001	0,004	0,007	0,009	0,014
	Promedio	0,001	0,004	0,007	0,009	0,014
3	1	0,001	0,004	0,006	0,009	0,012
	2	0,001	0,004	0,007	0,010	0,012
	3	0,001	0,004	0,007	0,010	0,013
	Promedio	0,001	0,004	0,007	0,009	0,012
4	1	0,001	0,004	0,008	0,012	0,015
	2	0,001	0,004	0,008	0,011	0,014
	3	0,001	0,004	0,008	0,012	0,014
	Promedio	0,001	0,004	0,008	0,012	0,015
5	1	0,001	0,003	0,006	0,008	0,011
	2	0,001	0,003	0,006	0,008	0,010
	3	0,001	0,003	0,005	0,008	0,010
	Promedio	0,001	0,003	0,006	0,008	0,010
<b>Promedio Total</b>		0,001	0,004	0,007	0,010	0,013

**Tabla A3.2. Concentraciones calculadas mediante la curva de calibración de Carbofuran.**

Día	Inyección	Nivel				
		1	2	3	4	5
1	1	0,001	0,004	0,007	0,010	0,013
	2	0,001	0,004	0,007	0,010	0,013
	3	0,001	0,004	0,007	0,010	0,013
	Promedio	0,001	0,004	0,007	0,010	0,013
2	1	0,001	0,004	0,007	0,009	0,013
	2	0,001	0,004	0,007	0,009	0,013
	3	0,001	0,004	0,007	0,009	0,013
	Promedio	0,001	0,004	0,007	0,009	0,013
3	1	0,001	0,004	0,007	0,009	0,013
	2	0,001	0,004	0,007	0,010	0,013
	3	0,001	0,004	0,007	0,011	0,014
	Promedio	0,001	0,004	0,007	0,010	0,013
4	1	0,001	0,005	0,008	0,011	0,015
	2	0,001	0,004	0,008	0,011	0,015
	3	0,001	0,004	0,008	0,012	0,015
	Promedio	0,001	0,004	0,008	0,011	0,015
5	1	0,001	0,003	0,005	0,009	0,011
	2	0,001	0,003	0,005	0,009	0,011
	3	0,001	0,003	0,005	0,008	0,010
	Promedio	0,001	0,003	0,005	0,008	0,011
	<b>Promedio Total</b>	0,001	0,004	0,007	0,010	0,013

**Tabla A3.3. Concentraciones calculadas mediante la curva de calibración de Carbarilo.**

Día	Inyección	Nivel				
		1	2	3	4	5
1	1	0,001	0,004	0,007	0,010	0,013
	2	0,001	0,004	0,007	0,010	0,013
	3	0,001	0,004	0,007	0,011	0,013
	Promedio	0,001	0,004	0,007	0,010	0,013
2	1	0,001	0,004	0,007	0,009	0,013
	2	0,001	0,004	0,007	0,009	0,013
	3	0,001	0,004	0,007	0,009	0,013
	Promedio	0,001	0,004	0,007	0,009	0,013
3	1	0,001	0,004	0,007	0,010	0,013
	2	0,001	0,004	0,007	0,010	0,013
	3	0,001	0,004	0,007	0,011	0,014
	Promedio	0,001	0,004	0,007	0,010	0,013
4	1	0,001	0,005	0,008	0,012	0,015
	2	0,001	0,004	0,009	0,012	0,015
	3	0,001	0,005	0,008	0,012	0,015
	Promedio	0,001	0,005	0,008	0,012	0,015
5	1	0,001	0,003	0,005	0,008	0,011
	2	0,001	0,003	0,005	0,008	0,010
	3	0,001	0,003	0,005	0,008	0,010
	Promedio	0,001	0,003	0,005	0,008	0,010
	<b>Promedio Total</b>	0,001	0,004	0,007	0,010	0,013

**Tabla A3.4. Concentraciones calculadas mediante la curva de calibración de Profenofos.**

Día	Inyección	Nivel				
		1	2	3	4	5
1	1	0,004	0,023	0,035	0,048	0,067
	2	0,004	0,021	0,034	0,047	0,066
	3	0,004	0,021	0,035	0,049	0,067
	Promedio	0,004	0,022	0,034	0,048	0,067
2	1	0,004	0,020	0,034	0,044	0,065
	2	0,004	0,020	0,033	0,044	0,066
	3	0,004	0,020	0,033	0,045	0,066
	Promedio	0,004	0,020	0,033	0,044	0,066
3	1	0,004	0,017	0,029	0,040	0,054
	2	0,004	0,017	0,030	0,041	0,054
	3	0,004	0,017	0,030	0,042	0,058
	Promedio	0,004	0,017	0,029	0,041	0,055
4	1	0,005	0,018	0,033	0,050	0,060
	2	0,005	0,019	0,034	0,050	0,064
	3	0,005	0,019	0,036	0,049	0,056
	Promedio	0,005	0,019	0,034	0,050	0,060
5	1	0,005	0,017	0,028	0,044	0,057
	2	0,005	0,018	0,029	0,045	0,057
	3	0,005	0,017	0,028	0,045	0,056
	Promedio	0,005	0,018	0,028	0,045	0,057
	<b>Promedio Total</b>	0,004	0,019	0,032	0,046	0,061

**Anexo 4: Datos y resultados de las muestras analizadas de brócoli.**

**Tabla A4.1. Datos de cada muestra y los factores que se usarán posteriormente para el cálculo de la concentración.**

<b>Código de la muestra</b>	<b>Masa de la muestra (g)</b>	<b>Agua agregada (g)</b>	<b>Factor 1</b>	<b>Masa pesada de la pasta (g)</b>	<b>Masa de la muestra tomada para el análisis (g)</b>	<b>Factor 2</b>
1A	166	75,0	0,689	14,5	10,0	5,0
2A	159	75,0	0,679	14,5	9,9	5,1
3A	169	75,0	0,692	14,1	9,8	5,1
4A	174	75,0	0,699	13,3	9,3	5,4
5A	185	75,0	0,712	14,1	10,1	5,0
6A	163	75,0	0,685	13,5	9,2	5,4
7A	180	75,0	0,706	13,8	9,7	5,1
8A	161	75,0	0,682	14,8	10,1	5,0
9A	165	75,0	0,688	14,5	9,9	5,0
10A	175	75,0	0,700	14,1	9,9	5,1
11A	169	75,0	0,692	14,8	10,2	4,9
12A	166	75,0	0,688	14,0	9,6	5,2
13A	158	75,0	0,678	14,2	9,6	5,2
14A	157	75,0	0,677	15,0	10,1	4,9
15A	151	75,0	0,668	15,5	10,4	4,8
16A	162	75,0	0,683	15,5	10,6	4,7
17A	161	75,0	0,683	15,5	10,6	4,7
18A	162	75,0	0,684	13,6	9,3	5,4
4Ar	174	75,0	0,699	3,9	2,8	18,2
19A	152	75,0	0,670	14,6	9,8	5,1
20A	170	75,0	0,694	15,0	10,4	4,8
1B	160	75,0	0,680	15,7	10,7	4,7
2B	156	75,0	0,675	13,5	9,1	5,5
3B	140	75,0	0,652	14,6	9,5	5,2
4B	162	75,0	0,684	15,2	10,4	4,8
5B	162	75,0	0,684	16,3	11,1	4,5
6B	174	75,0	0,699	14,9	10,4	4,8
7B	178	75,0	0,703	15,6	11,0	4,6
8B	178	75,0	0,703	15,9	11,2	4,5
9B	165	75,0	0,688	14,9	10,3	4,9
10B	166	75,0	0,688	14,9	10,2	4,9

**Tabla A4.2. Muestra las respuestas instrumentales y los resultados del análisis de Metomil en brócoli.**

Código de la muestra	Respuesta instrumental 1	Respuesta instrumental 2	Concentración (mg/Kg)		
			Primera inyección	Segunda inyección	Promedio
BLANCO	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
1A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
2A	1115,3	934,9	0,062	0,052	0,057
3A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
4A	2503,9	2426,2	0,145	0,141	0,143
5A	165,1	157,6	0,011	0,010	0,010
6A	34,3	36,9	0,004	0,004	<0,005
7A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
8A	991,1	956,3	0,054	0,052	0,053
9A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
10A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
11A	230,9	234,7	0,014	0,014	0,014
12A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
13A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
14A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
15A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
16A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
17A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
18A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
4Ar	908,9	942	0,182	0,188	0,185
19A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
20A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
1B	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
2B	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
3B	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
4B	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
5B	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
6B	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
7B	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
8B	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
9B	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
10B	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002

**Tabla A4.3. Muestra las respuestas instrumentales y los resultados del análisis de Carbofuran en brócoli.**

Código de la muestra	Respuesta instrumental 1	Respuesta instrumental 2	Concentración (mg/Kg)		
			Primera inyección	Segunda inyección	Promedio
BLANCO 1	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
1A	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
2A	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
3A	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
4A	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
5A	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
6A	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
7A	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
8A	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
9A	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
10A	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
11A	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
12A	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
13A	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
14A	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
15A	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
16A	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
17A	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
18A	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
4Ar	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
19A	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
20A	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
1B	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
2B	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
3B	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
4B	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
5B	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
6B	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
7B	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
8B	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
9B	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001
10B	ND	ND	<0,001	<0,001	<0,001

**Tabla A4.4. Muestra las respuestas instrumentales y los resultados del análisis de Carbarilo en brócoli.**

<b>Código de la muestra</b>	<b>Respuesta instrumental 1</b>	<b>Respuesta instrumental 2</b>	<b>Concentración 1 (mg/Kg)</b>	<b>Concentración 2 (mg/Kg)</b>	<b>Concentración promedio (mg/Kg)</b>
BLANCO 1	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
1A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
2A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
3A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
4A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
5A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
6A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
7A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
8A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
9A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
10A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
11A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
12A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
13A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
14A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
15A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
16A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
17A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
18A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
4Ar	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
19A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
20A	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
1B	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
2B	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
3B	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
4B	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
5B	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
6B	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
7B	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
8B	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
9B	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002
10B	ND	ND	<0,002	<0,002	<0,002

**Tabla A4.5. Muestra las respuestas instrumentales y los resultados del análisis de Profenofos en brócoli.**

<b>Código de la muestra</b>	<b>Respuesta instrumental 1</b>	<b>Respuesta instrumental 2</b>	<b>Concentración 1 (mg/Kg)</b>	<b>Concentración 2 (mg/Kg)</b>	<b>Concentración promedio (mg/Kg)</b>
BLANCO 1	ND	ND	ND	ND	<0,005
1A	ND	ND	ND	ND	<0,005
2A	ND	ND	ND	ND	<0,005
3A	ND	ND	ND	ND	<0,005
4A	ND	ND	ND	ND	<0,005
5A	ND	ND	ND	ND	<0,005
6A	ND	ND	ND	ND	<0,005
7A	ND	ND	ND	ND	<0,005
8A	119633	120880	0,106	0,107	<b>0,107</b>
9A	ND	ND	ND	ND	<0,005
10A	ND	ND	ND	ND	<0,005
11A	33557	33426	0,033	0,033	<b>0,033</b>
12A	ND	ND	ND	ND	<0,005
13A	ND	ND	ND	ND	<0,005
14A	ND	ND	ND	ND	<0,005
15A	ND	ND	ND	ND	<0,005
16A	ND	ND	ND	ND	<0,005
17A	ND	ND	ND	ND	<0,005
18A	ND	ND	ND	ND	<0,005
4Ar	ND	ND	ND	ND	<0,005
19A	ND	ND	ND	ND	<0,005
20A	ND	ND	ND	ND	<0,005
1B	ND	ND	ND	ND	<0,005
2B	ND	ND	ND	ND	<0,005
3B	ND	ND	ND	ND	<0,005
4B	ND	ND	ND	ND	<0,005
5B	ND	ND	ND	ND	<0,005
6B	ND	ND	ND	ND	<0,005
7B	ND	ND	ND	ND	<0,005
8B	ND	ND	ND	ND	<0,005
9B	ND	ND	ND	ND	<0,005
10B	ND	ND	ND	ND	<0,005

**Anexo 5: Hojas de validación.**

**Tabla A5.1. Hoja de validación de Metomil.**

<b>LABORATORIO DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS DE AGROCALIDAD</b>						
<b>HOJA DE VALIDACIÓN</b>						
<b>Método analítico:</b>	PEE/L-P/13					
Tipo de método:	Cuantitativo					
Analito:	Metomil					
Unidades:	mg/Kg					
Matriz:	Brócoli					
<b>Función de respuesta (más probable)</b>						
Pendiente			123299			
Intersección			-40			
<b>Precisión, Recuperación, Incertidumbre</b>						
Nivel	Repetitividad		Precisión Intermedia		Recuperación (%)	U expandida (mg/Kg)
	Sr	CVr (%)	SR	CVR (%)		
1	1,3E-04	13,7	1,9E-04	19,8	97,3	2,3E-04
2	7,8E-04	19,8	4,9E-04	12,5		4,8E-04
3	1,3E-03	18,9	1,1E-03	16,0	<b>RSD</b>	6,4E-04
4	1,7E-03	16,8	1,4E-03	14,1	12,6	1,1E-03
5	2,5E-03	19,6	1,9E-03	14,5		1,7E-03
<b>Límite de detección y límite de cuantificación en matriz</b>						
<b>Límite de detección (LD):</b>			0,002 mg/Kg			
<b>Límite de cuantificación (LC):</b>			0,002 mg/Kg			
<b>Selectividad / especificidad</b>						
Interferencias conocidas			No			
<b>Intervalo de trabajo en matriz (mg/Kg)</b>			0,005	a	0,064	
<b>Criterios de aceptación y rechazo</b>						
<b>Curva de calibración</b>	A través de toda la curva de calibración residuales menores al +/- 20%					
<b>Método</b>	% de recuperación	70%	a	120%		
<i>El presente método queda validado para su uso en el laboratorio por personas cualificadas para ello de acuerdo con las características que se detallan en esta hoja</i>						

**Tabla A5.2. Hoja de validación de Carbofuran.**

<b>LABORATORIO DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS DE AGROCALIDAD</b>						
<b>HOJA DE VALIDACIÓN</b>						
<b>Método analítico:</b>	PEE/L-P/13					
Tipo de método:	Cuantitativo					
Analito:	Carbofuran					
Unidades:	mg/Kg					
Matriz:	Brócoli					
<b>Función de respuesta (más probable)</b>						
Pendiente			13071281			
Intersección			-1753			
<b>Precisión, Recuperación, incertidumbre</b>						
Nivel	Repetitividad		Precisión Intermedia		Recuperación (%)	U expandida (mg/Kg)
	Sr	CVR (%)	SR	CVR (%)		
1	5,3E-05	5,4	1,9E-04	19,1	91,1	2,5E-04
2	4,1E-04	10,4	4,4E-04	11,3		2,8E-04
3	5,2E-04	7,5	1,1E-03	15,6	<b>RSD</b>	4,9E-04
4	1,2E-03	12,1	1,2E-03	12,4	8,8	1,2E-03
5	9,5E-04	7,5	1,5E-03	11,7		8,8E-04
<b>Límite de detección y límite de cuantificación en matriz</b>						
<b>Límite de detección (LD):</b>			0,001 mg/Kg			
<b>Límite de cuantificación (LC):</b>			0,001 mg/Kg			
<b>Selectividad / especificidad</b>						
Interferencias conocidas			No			
<b>Intervalo de trabajo en matriz (mg/Kg)</b>				0,005	A	0,064
<b>Criterios de aceptación y rechazo</b>						
<b>Curva de calibración</b>	A través de toda la curva de calibración residuales menores al +/- 20%					
<b>Método</b>	% de recuperación	70%	A	120%		
<i>El presente método queda validado para su uso en el laboratorio por personas cualificadas para ello de acuerdo con las características que se detallan en esta hoja</i>						

**Tabla A5.3. Hoja de validación de Carbarilo.**

<b>LABORATORIO DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS DE AGROCALIDAD</b>						
<b>HOJA DE VALIDACIÓN</b>						
<b>Método analítico:</b>	PEE/L-P/13					
Tipo de método:	Cuantitativo					
Analito:	Carbarilo					
Unidades:	mg/Kg					
Matriz:	Brócoli					
<b>Función de respuesta (más probable)</b>						
Pendiente			1025169			
Intersección			-265			
<b>Precisión, Recuperación, incertidumbre</b>						
Nivel	Repetitividad		Precisión intermedia		Recuperación (%)	U expandida (mg/Kg)
	Sr	CVr (%)	Sr	CVr (%)		
	1,4E-04	14,3	1,8E-04	17,8	92,0	2,2E-04
1	6,8E-04	17,2	5,2E-04	13,2		3,3E-04
2	6,4E-04	9,2	1,1E-03	16,2	<b>RSD</b>	5,2E-04
3	8,8E-04	8,9	1,4E-03	13,8	10,5	1,2E-03
4	1,1E-03	8,2	1,7E-03	13,3		9,1E-04
<b>Límite de detección y límite de cuantificación en matriz</b>						
<b>Límite de detección (LD):</b>			0,002 mg/Kg			
<b>Límite de cuantificación (LC):</b>			0,002 mg/Kg			
<b>Selectividad / especificidad</b>						
Interferencias conocidas			No			
<b>Intervalo de trabajo en matriz (mg/Kg)</b>				0,005	a	0,064
<b>Criterios de aceptación y rechazo</b>						
<b>Curva de calibración</b>	A través de toda la curva de calibración residuales menores al +/- 20%					
<b>Método</b>	% de recuperación	70%	a	120%		
<i>El presente método queda validado para su uso en el laboratorio por personas cualificadas para ello de acuerdo con las características que se detallan en esta hoja</i>						

**Tabla A5.4. Hoja de validación de Profenofos.**

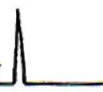
<b>LABORATORIO DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS DE AGROCALIDAD</b>						
<b>HOJA DE VALIDACIÓN</b>						
<b>Método analítico:</b>	PEE/L-P/13					
Tipo de método:	Cuantitativo					
Analito:	Profenofos					
Unidades:	mg/Kg					
Matriz:	Brócoli					
<b>Función de respuesta (más probable)</b>						
Pendiente			6215136			
Intersección			-5223			
<b>Precisión, Recuperación, Incertidumbre</b>						
Nivel	Repetibilidad		Precisión Intermedia		Recuperación (%)	U expandida (mg/Kg)
	Sr	CVr (%)	SR	CVR (%)		
1	3,9E-04	8,5	6,2E-04	13,5	99,8	8,6E-04
2	2,1E-03	11,5	2,0E-03	10,8		1,9E-03
3	2,6E-03	8,2	2,9E-03	9,0	<b>RSD</b>	1,9E-03
4	3,0E-03	6,5	3,5E-03	7,5	10,4	2,0E-03
5	7,3E-03	12,2	5,5E-03	9,2		6,0E-03
<b>Límite de detección y límite de cuantificación en matriz</b>						
<b>Límite de detección (LD):</b>			0,004 mg/Kg			
<b>Límite de cuantificación (LC):</b>			0,005 mg/Kg			
<b>Selectividad / especificidad</b>						
Interferencias conocidas			No			
<b>Intervalo de trabajo en matriz (mg/Kg)</b>				0,023	A	0,299
<b>Criterios de aceptación y rechazo</b>						
<b>Curva de calibración</b>	A través de toda la curva de calibración residuales menores al +/- 20%					
<b>Método</b>	% de recuperación	70%	a	120%		
<i>El presente método queda validado para su uso en el laboratorio por personas cualificadas para ello de acuerdo con las características que se detallan en esta hoja</i>						

Anexo 6: Certificados de los estándares utilizados.

1 Cbl 1

# Certificate of Analysis

Dr. Ehrenstorfer




**Product Identification**

10980000 Carbaryl  
 CA 1-Naphthalenyl methylcarbamate  
 IUPAC 1-Naphthyl methylcarbamate  
 Formula C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>  
 Mol Weight 201.23  
 CAS No. 63-25-2

**Reference Materials for Residue Analysis**


Expiry Date 27.03.2013  
 Lot Number 90308  
 Store at 20 °C ±4 °C

Please note: The expiry date is valid under recommended storage conditions only.

<b>Toxicological Data</b>  R Code 22-40-60 S Code 22-36/37-24-48-61 LD50 (Rats female/male in mg/kg) 230		<b>Physical Data</b> Phase crystalline solid Color colourless Melt. Range 145,1 °C Vapour pressure <5.3 mPa at 25 °C Solubility in water 0.04 g/l at 30 °C Boiling Range (Z.)	
<b>Analytical Data</b> Detection: HPLC/DAD Column: ReproSil 100 C18 5µ 250x3 Inj.-Vol: 10,00 µl Flow: 0,5 ml/min Ret.-Time: 2,74 min.		<b>Method Details:</b> Methanol:H <sub>2</sub> O 9:1	
Identity: UV, RT, MS Comment: Purity was confirmed by external standard method.			
Water Content 0,0 % Det. Purity 98,9 %		Determined by Karl-Fischer Titration Tolerance/Uncertainty +/- 0,5 %	
The uncertainty/tolerance of this standard is calculated in accordance with the EURACHEM/CITAC Guide - Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement - Second Edition. The uncertainty given is the expanded combined uncertainty and represents an estimated standard deviation equal to the positive square root of the total variance of the uncertainty of components. The expanded uncertainty is U which is U <sub>c</sub> (y)*K, where K is the coverage factor at the 95% confidence level (K=2). The expanded uncertainty is based on the combination of uncertainties associated with each individual operation involved in the preparation of this product.			

Certified on 27.03.2009

by Dr. H. Möller

Authorized copy  
 from the original  
 03. MRZ. 2010  
 Sign.: 



Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers · Bgm.-Schloesser-Str. 6 A · 86199 Augsburg · Germany  
 Phone +49 821 906080 Fax +49 821 9060888 info@analytical-standards.com  
 The warranty for this product is limited to the purchasing price of this product.



1Cbr2

# Certificate of Analysis

Dr. Ehrenstorfer

Reference Materials for Residue Analysis

## Product Identification

11010000 Carbofuran

CA 2,3-Dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranyl methylcarbamate

IUPAC 2,3-Dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl methylcarbamate

Formula C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>

Mol Weight 221.26




CAS No. 1563-66-2

Expiry Date 09.09.2012

Lot Number 80820


Store at 20 °C ±4 °C

Please note: The expiry date is valid under recommended storage conditions only.

Toxicological Data	Physical Data
   <p>R Code 26/28-50/53 S Code 36/37-45-60-61 LD50 (Rats female/male in mg/kg) 8</p>	<p>Phase crystalline solid      Vapour pressure 2.7 mPa at 33 °C Color colourless              Solubility in water 0.32 g/l at 25 °C Mel Range 159,5 °C              Boiling Range (lit.)</p>
<p><b>Analytical Data</b> Detection: HPLC/DAD                      Method Details: Column: ReproSil-Pur ODS3 5µ 250x3      Acetonitrile:H<sub>2</sub>O 4:1 Inj.-Vol.: 10,00 µl Flow: 1,0 ml/min Ret.-Time: 1,38 min.</p>	
<p>Identity: UV, RT Comment Purity was confirmed by external standard method.</p>	
<p>Water Content 0,5 %      Determined by Karl-Fischer Titration Det. Purity 98,5 %      Tolerance/Uncertainty +/- 0,5 %</p>	
<p>The uncertainty/tolerance of this standard is calculated in accordance with the EURACHEM/CITAC Guide - Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement - Second Edition. The uncertainty given is the expanded combined uncertainty and represents an estimated standard deviation equal to the positive square root of the total variance of the uncertainty of components. The expanded uncertainty is U which is Uc(y)*K, where K is the coverage factor at the 95% confidence level (K=2). The expanded uncertainty is based on the combination of uncertainties associated with each individual operation involved in the preparation of this product.</p>	

Certified on 10.09.2008  
by Dr. J. Heidrich



 **Novakimia colombiana**  
 Fine Chemicals - High Purity Standards  
 Cra. 69 Bt No. 24-19 Int. CV 45 - 111  
 Telefax: 295 9908 - 941 9100  
 Bogotá, D.C.



Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers · Bgm.-Schlosser-Str. 6 A · 86199 Augsburg · Germany  
 Phone +49 821 906080 Fax +49 821 9060888 info@analytical-standards.com  
 The warranty for this product is limited to the purchasing price of this product.

# Certificate of Analysis

Dr. Ehrenstorfer


## Product Identification

15030000 Methomyl  
CA Methyl-N-[(methylamino)carbonyloxy]ethanimidothioate  
IUPAC S-Methyl N-(methylcarbamoyloxy)thioacetimidate  
Formula C5H10N2O2S  
Mol.Weight 162.21  
CAS No. 16752-77-5

## Reference Materials for Residue Analysis

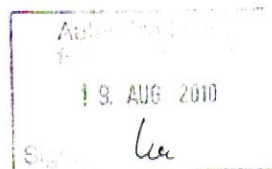
Expiry Date 07.05.2013  
Lot Number 90417  
Store at 20 °C ±4 °C

Please note: The expiry date is valid under recommended storage conditions only.

Toxicological Data	Physical Data
	Phase crystalline solid Colour colourless Melting Range 79.6 °C
R Code 28-50/53 S Code 22-36/37-45-60-61 LD50 (Rats female/male in mg/kg) 17-24	Vapour pressure 6.65 mPa at 25 °C Solubility in water 58 g/l at 25 °C Boiling Range (lit.)
<b>Analytical Data</b> Detection: HPLC/DAD Column: ReproSil 100 C18 5µ 250x3 Inj.-Vol.: 10,00 µl Flow: 0,5 ml/min Ret.-Time: 2,44 min.	Method Details: Methanol:H2O 9:1
Identity: UV, RT Comment: Purity was determined by external standard method.	
Water Content 0,4 % Det. Purity 98,5 %	Determined by Karl-Fischer Titration Tolerance/Uncertainty +/- 0,5 %
The uncertainty/tolerance of this standard is calculated in accordance with the EURACHEM/CITAC Guide - Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement - Second Edition. The uncertainty given is the expanded combined uncertainty and represents an estimated standard deviation equal to the positive square root of the total variance of the uncertainty of components. The expanded uncertainty is U which is Uc(y)*K, where K is the coverage factor at the 95% confidence level (K=2). The expanded uncertainty is based on the combination of uncertainties associated with each individual operation involved in the preparation of this product.	

Certified on 07.05.2009

by Fr. Vicek



Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers - Bgm.-Schlosser-Str. 6 A - 86199 Augsburg - Germany  
Phone +49 821 906080 Fax +49 821 9060888 info@analytical-standards.com  
The warranty for this product is limited to the purchasing price of this product.



# Certificate of Analysis

Dr. Ehrenstorfer

Reference Materials for  
Residue Analysis

## Product Identification

16330000 Profenofos

CA O-(4-Bromo-2-chlorophenyl) O-ethyl S-propyl phosphorothioate

IUPAC O-(4-Bromo-2-chlorophenyl) O-ethyl S-propyl phosphorothioate

Formula C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>BrClO<sub>3</sub>PS

Mol Weight 373.6


CAS No. 41198-08-7

Expiry Date 23.09.2012

Lot Number 00805

Store at -18 °C ±4 °C

Please note: The expiry date is valid under recommended storage conditions only.

Toxicological Data	Physical Data
 R Code 20/21/22-50/53 S Code 36/37-60-61 LD50 (Rats female/male in mg/kg) 358	Phase liquid Color yellowish Met. Range Vapour pressure 1.3 mPa at 20 °C Solubility in water 0.02 g/l at 20 °C Boiling Range (lit.)
<b>Analytical Data</b> Detection: HPLC/DAD Column: ReproSil 100 C18 5µ 250x3 Inj.-Vol.: 1,00 µl Flow: 1,0 ml/min Ret.-Time: 2,97 min.	<b>Method Details:</b> Acetonitrile:H2O 4:1
Identity RT, UV Comment Purity was determined by external standard method.	
Water Content 0,1 % Det. Purity 95,0 %	Determined by Karl-Fischer Titration Tolerance/Uncertainty +/- 1,0 %
The uncertainty/tolerance of this standard is calculated in accordance with the EURACHEM/CITAC Guide - Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement - Second Edition. The uncertainty given is the expanded combined uncertainty and represents an estimated standard deviation equal to the positive square root of the total variance of the uncertainty of components. The expanded uncertainty is U which is Uc(y)*K, where K is the coverage factor at the 95% confidence level (K=2). The expanded uncertainty is based on the combination of uncertainties associated with each individual operation involved in the preparation of this product.	

Certified on 23.09.2010

by Dr. H. Meinholz



The Laboratory Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers is accredited by DGA as indicated by the Accreditation Certificate DGA-PL-4536.00 based on DIN EN ISO/IEC 17025:2005 for the weighing of amounts of substances for the preparation of standard solutions.

Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers · Bgm.-Schlosser-Str. 5 A · 86199 Augsburg Germany  
Phone +49 821 906080 Fax +49 821 9060888 info@analytical-standards.com  
The warranty for this product is limited to the purchasing price of this product.



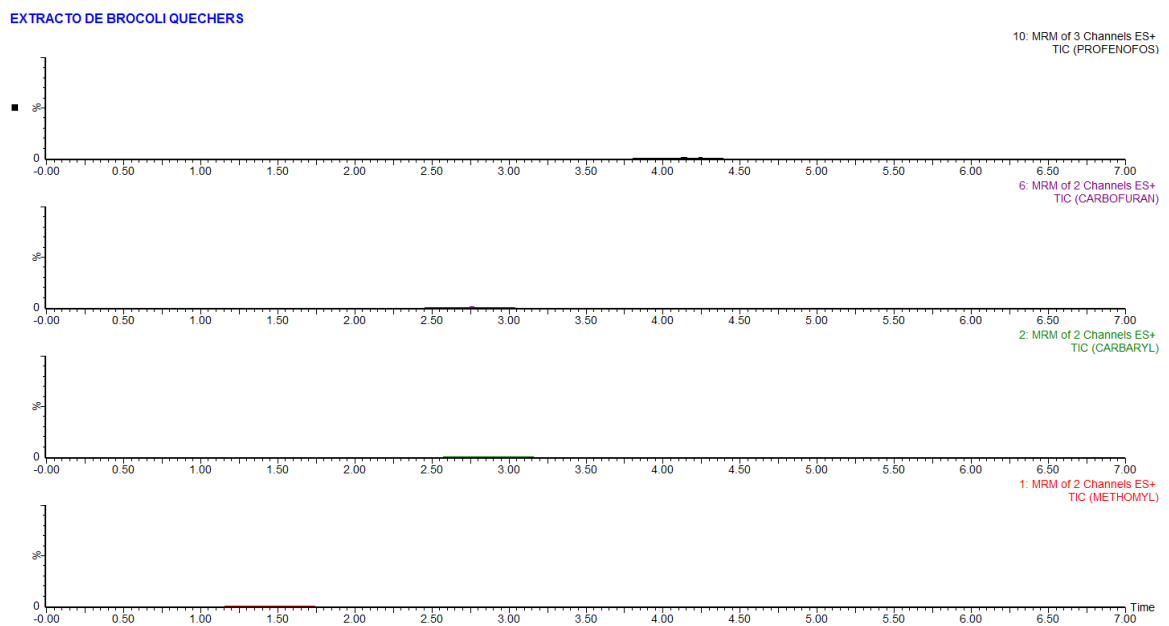
DGA-PL-4536.00

## Anexo 7: Cromatograma de un blanco de solvente, blanco de matriz, estándar en matriz y una muestra

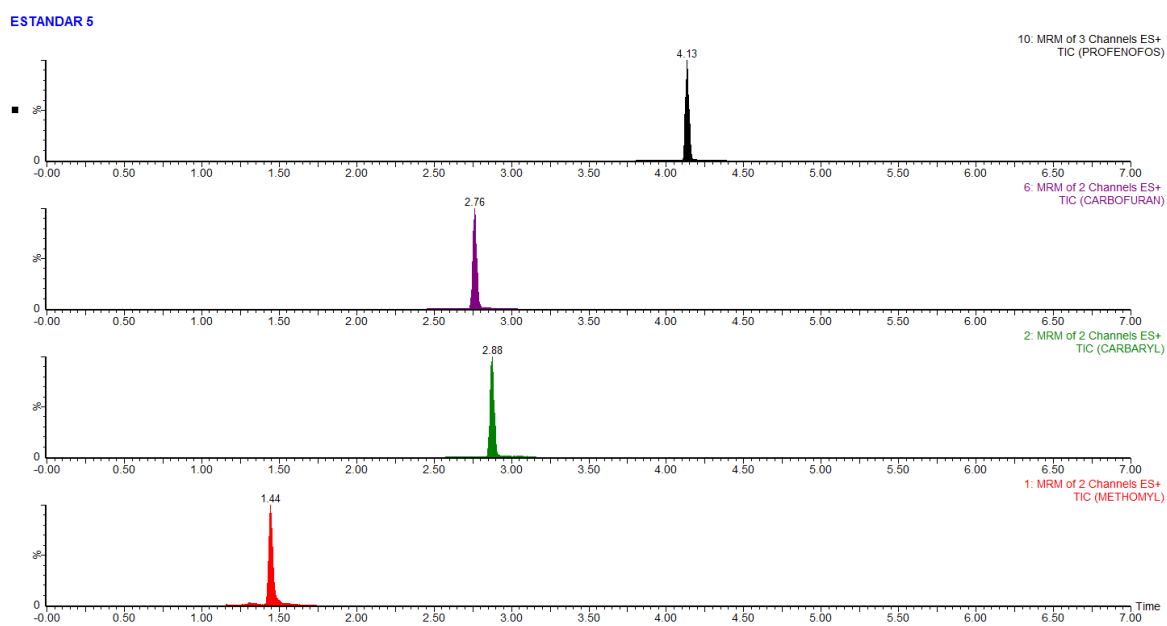
### Figura A7.1. Cromatograma de una inyección de eluyente A.



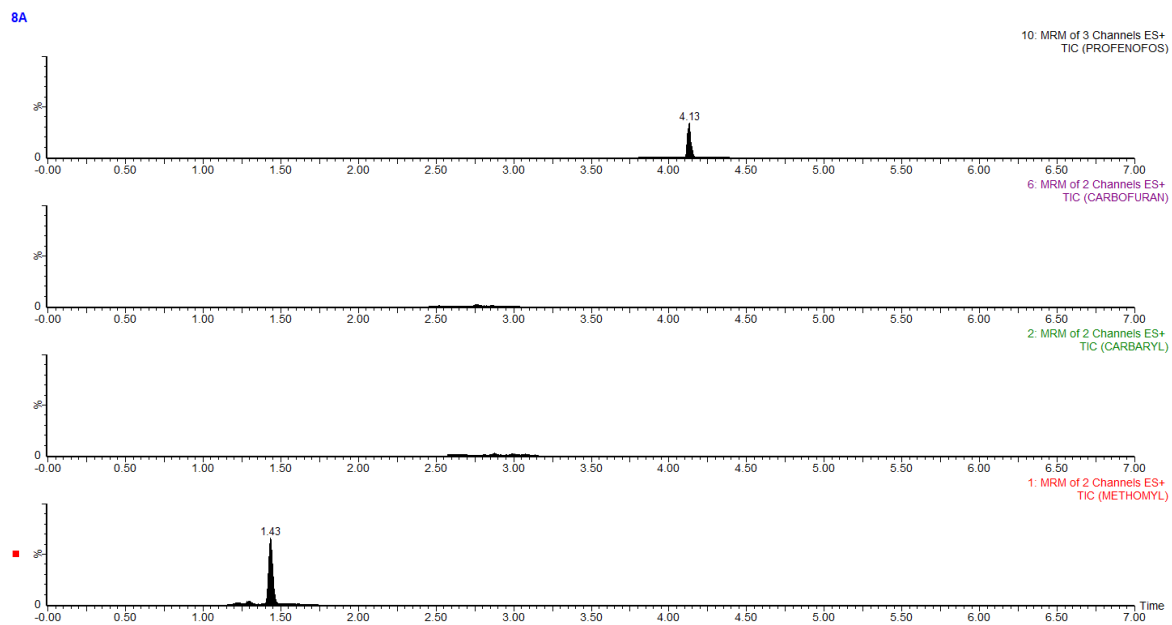
### Figura A7.2. Cromatograma de un blanco de brócoli orgánico.



**Figura A7.3. Cromatograma de un estándar en matriz de 0,013 mg/Kg de Metomil, Carbarilo, Carbofuran y 0,060 mg/Kg de Profenofos.**



**Figura A7.4. Cromatograma de la muestra "8A".**



## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Francisco Javier Iturra Moreno, C.I. 171085588-1, autor del trabajo de graduación intitulado “Determinación de residuos de metomil, carbofuran, carbarilo y profenofos en brócoli (*Brassica oleracea*) por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS)”, previa a la obtención del grado académico de Licenciado 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, 2012

Sr. Francisco Javier Iturra Moreno

C.I. 171085588-1