

Universidad del Valle de Guatemala

Facultad de Ingeniería



Validación de la Metodología para la Determinación de Multiresiduos de Pesticidas Organofosforados, Organoclorados y Piretroides en Alimentos Grasos y no Grasos por Cromatografía de Gas Empleando Doble Detectores de Captura de Electrones (ECD) y Detector Fotométrico de Llama (FPD)

Trabajo de graduación presentado  
por Scarleth Marie Arévalo Pérez  
para optar al grado académico de  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Guatemala

2011



Validación de la Metodología para la Determinación de Multiresiduos de Pesticidas Organofosforados, Organoclorados y Piretroides en Alimentos Grasos y no Grasos por Cromatografía de Gas Empleando Doble Detectores de Captura de Electrones (ECD) y Detector Fotométrico de Llama (FPD)

Universidad del Valle de Guatemala

Facultad de Ingeniería



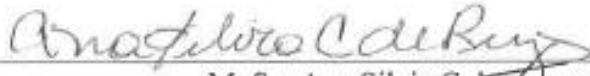
Validación de la Metodología para la Determinación de Multiresiduos de Pesticidas Organofosforados, Organoclorados y Piretroides en Alimentos Grasos y no Grasos por Cromatografía de Gas Empleando Doble Detectores de Captura de Electrones (ECD) y Detector Fotométrico de Llama (FPD)

Trabajo de graduación presentado  
por Scarleth Marie Arévalo Pérez  
para optar al grado académico de  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos


Guatemala

2011

Vo. Bo. :

(f)   
M. Sc. Ana Silvia Colmenares de Ruiz.  
Asesora

Tribunal Examinador:

(f)   
Ph. D. Ricardo Bressani.

(f)   
M. Sc. Ana Silvia Colmenares de Ruiz.  
Asesora

(f)   
M. Sc. Patricia Palacios de Palomo.

Fecha de aprobación: 17 de noviembre del 2011



# ÍNDICE

LISTA DE TABLAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
RESUMEN .....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	2
A. ¿Qué son los pesticidas? .....	2
B. Límite Máximo Residual (LMR) .....	2
C. Ingesta Diaria Admisible (IDA) .....	2
D. Pesticidas prohibidos o de uso restringido en Guatemala .....	3
E. Pesticidas organoclorados (OC) .....	4
F. Pesticidas organofosforados.....	5
G. Generalidades de cromatografía de gases.....	6
1. Descripción del sistema. ....	10
2. Automuestreador líquido.....	10
3. Puerto de inyección. ....	12
4. Detectores.....	12
III. JUSTIFICACIÓN .....	14
IV. OBJETIVOS.....	15
A. Objetivo General .....	15
B. Objetivos específicos.....	15
V. METODOLOGÍA .....	16
A. Confirmación de la identidad y selectividad .....	17
B. Linealidad .....	17
C. Límite de detección y cuantificación.....	17
D. Precisión.....	18
E. Exactitud .....	19
F. Preparación de las soluciones estándar de pesticidas.....	19
G. Equipo y medidas de seguridad .....	20
H. Preparación de mezclas de trabajo de estándares de pesticidas .....	20

I.	Almacenamiento de estándares de pesticidas y soluciones preparadas .....	22
J.	Preparación de curva de calibración.....	23
VI.	RESULTADOS .....	25
VII.	DISCUSIÓN.....	28
VIII.	CONCLUSIONES.....	31
IX.	RECOMENDACIONES.....	32
X.	BIBLIOGRAFÍA .....	33
XI.	ANEXOS .....	34

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Propiedades físicas y químicas del clorpirifos etil.....	5
Tabla 2 Propiedades físicas y químicas del clorpirifos etil continuación.....	6
Tabla 3 Propiedades de solubilidad del clorpirifos etil.....	6
Tabla 4 Configuración del sistema cromatográfico .....	10
Tabla 5 Componentes del auto muestreador líquido.....	11
Tabla 6 Principales características de un detector ideal.....	12
Tabla 7 Tipos de detectores existentes.....	13
Tabla 8 Límites de repetibilidad .....	18
Tabla 9 Límites de reproducibilidad .....	19
Tabla 10 Preparación de la solución madre de la mezcla de pesticidas.....	22
Tabla 11 Curva de calibración para la mezcla de pesticidas.....	23
Tabla 12 Preparación de la curva de calibración .....	23
Tabla 13 Curva de calibración .....	25
Tabla 14 Regresión lineal .....	25
Tabla 15 Resultados de la exactitud.....	26
Tabla 16 Porcentaje de recuperación .....	26
Tabla 17 Conclusión de la recuperación experimental .....	26
Tabla 18 Resultados en la determinación de precisión .....	27
Tabla 19 Resultados en la determinación de incertidumbre del método .....	27

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Pesticidas prohibidos o de uso restringido en Guatemala .....	3
Figura 2 Fórmula general de los compuestos organofosforados.....	5
Figura 3 Diagrama de un cromatógrafo de gases.....	7
Figura 4 Inyector de muestra para un GC .....	8
Figura 5 Puerto de inyección de un GC .....	8
Figura 6 Consumibles dentro del puerto de inyección.....	9
Figura 7 Columna Capilar y horno .....	9
Figura 8 Mezcla de estándares Phos 2, 100 ppb's .....	34

## RESUMEN

El mercado globalizado en la industria de alimentos cada día es más exigente. Actualmente las evaluaciones de residuos pesticidas son requeridas previo a exportación e importación de alimentos. De allí la relevancia de contar con laboratorios de calidad analíticos que provean resultados de rutina confiables. Un medio por el cual esto puede ser logrado es la verificación *in situ* de los métodos del laboratorio. En este estudio se evaluaron los 6 parámetros requeridos para la verificación de un método previamente validado por una organización internacionalmente reconocida. Los 6 parámetros evaluados fueron: selectividad e identidad del método, linealidad, límite de detección y cuantificación, precisión y exactitud e incertidumbre del método para el pesticida clorpirifos etil en harina de trigo. Se obtuvo el cumplimiento de los rangos aceptables para los 6 parámetros y se verificó el método de determinación de residuos para el clorpirifos etil empleando cromatografía de gases con detector fotométrico de llama.

**Palabras clave:** Cromatografía de gases, Detector fotométrico de llama (FPD), Pesticidas, Clorpirifos etil, harina de trigo, industria de alimentos.

## I. INTRODUCCIÓN

La industria química ha desarrollado y aplicado pesticidas con el propósito de proteger los cultivos de plagas. Sin embargo, su uso representa un riesgo toxicológico debido a los contenidos residuales de los mismos en los alimentos. En la actualidad es de gran relevancia en el mercado globalizado que los residuos de pesticidas en los alimentos se encuentren dentro de los niveles aceptables, según regulaciones, con el fin de evitar que representen un riesgo para el consumidor.

La seguridad y calidad alimentaria toma un papel protagónico en la determinación de residuos de pesticidas en alimentos. Con el propósito de demostrar la confiabilidad de los resultados analíticos de los laboratorios de aseguramiento de la calidad analítica en alimentos, se requiere la verificación *in situ* de un método previamente validado.

Seis parámetros fueron evaluados para determinar la verificación del método para clorpirifosetil en harina de trigo. Los parámetros evaluados incluyen la confirmación de la identidad y selectividad del método, la determinación del coeficiente de correlación lineal entre la concentración y respuesta por parte del detector fotométrico de llama (FPD), determinación del límite de detección y cuantificación, precisión y exactitud respecto al valor esperado e incertidumbre del método.

## II. MARCO TEÓRICO

### A. ¿Qué son los pesticidas?

*«Los pesticidas son empleados para proteger los cultivos antes y después de que la cosecha se infeste con plagas y causen enfermedades. A consecuencia de su uso es probable la presencia de residuos de pesticidas los productos tratados. De allí que sea necesario asegurarse que tales residuos no sean encontrados alimentos o piensos a niveles que presenten un riesgo inaceptable a los humanos»* ([http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/index_en.htm))

Instituciones internacionales han establecido límites máximos residuales (LMR) a manera de proteger al consumidor de la exposición a niveles inaceptables de residuos de pesticidas en alimentos y piensos.

Algunas de estas instituciones cabe mencionar: *Codex Alimentarius*, por sus siglas CODEX; la Comisión Europea; Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR); Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).

### B. Límite Máximo Residual (LMR)

El límite máximo residual corresponde al nivel legal máximo en concentración para residuos de pesticidas en alimentos o piensos basado en buenas prácticas agrícolas y de esta manera se asegura una mínima exposición posible por parte del consumidor.

Por ejemplo, la Regulación (EC) No 396/2005 establece LMR de pesticidas permitidos en productos de origen vegetal o animal para consumo de humanos o animales. Los LMR no son simplemente establecidos por sus niveles toxicológicos sino también se derivan luego de una rigurosa investigación de las propiedades activas de las sustancias y comportamiento del residuo en la cosecha tratada. A manera de asegurar la seguridad del consumidor es indispensable un riguroso análisis de riesgos previo al establecimiento de LMR.

### C. Ingesta Diaria Admisible (IDA)

Otra forma de evaluar el consumo de pesticidas es a través de la Ingesta Diaria Admisible (IDA). El nivel de LMR es determinado por pruebas supervisadas. Tanto la IDA como la Dosis de Referencia Aguda (DRA) se derivan de la información toxicológica del pesticida.

La Ingesta Diaria Admisible (ADI) refleja la toxicidad crónica. Es un estimado de la cantidad de sustancia en el alimento, expresado en base al peso corporal que puede ser ingerido diariamente a lo largo de la vida sin un riesgo apreciable a la salud del consumidor.

La Dosis de Referencia Aguda (DRA) refleja la toxicidad aguda. Es un estimado de la cantidad de sustancia en el alimento, expresado con base al peso corporal que puede ser ingerido por un corto intervalo de tiempo sin un riesgo apreciable a la salud del consumidor.

Para determinar si un LMR es aceptable, la ingesta de residuos a través de alimentos que pueden ser tratados con un pesticida es calculada y comparada con la IDA y DRA, en una ingesta a corto y largo plazo y para todos los grupos alimenticios disponibles.

En caso que el LMR no sea seguro, el límite más bajo para la determinación analítica (LoD) se establece como el LMR. El LoD es también establecido para cosechas en las que no hay evidencia de uso del pesticida o cuando su uso no permite ser detectado. Por defecto LoD en la legislación europea es 0.01 mg/kg.

La *European Food Safety Authority* (EFSA) es responsable del análisis de riesgos y evaluación de un nuevo LMR.

#### D. Pesticidas prohibidos o de uso restringido en Guatemala

A continuación se listan los 15 pesticidas prohibidos o de uso restringido para Guatemala.

Figura 1 Pesticidas prohibidos o de uso restringido en Guatemala

GENÉRICO	ACUERDO	FECHA	CONDICIÓN
2,4-D ESTER	ACUERDO MINISTERIAL S. N.	14-06-82	RESTRINGIDO
ALDRIN	A. M. 00003	21-01-88	PROHIBIDO
BROMURO DE METILO	DECRETO No. 11097	06-11-97	RESTRINGIDO
CANFENO CLORADO	A. M. 00003	21-01-88	PROHIBIDO
CLORDANO	A. M. 00003	21-01-88	"
CLORDIMEFORM	A. M. 00003	21-01-88	"
DDT	ACUERDO GUBERNATIVO 27-76	15-11-76	"
DIELDRIN	A. M. 00003	21-01-88	"
ENDRIN	A. M. 00003	21-01-88	"
ETIL PARATION	A. M. 00003	21-01-88	"
HEPTACLORO	A. M. 00003	21-01-88	"
HEXACLOROBENCENO (HCB)	A. M. 00003	21-01-88	"
LEPTOFOS	ACUERDO MINISTERIAL S. N.	26-10-77	"
LINDANO	A. M. 00003	21-01-88	"
METAMIDOFOS (METAMIDOPHOS)	DECRETO No. 13-2009	23-04-2009	PROHIBIDO

Fuente: Departamento de Registro de Insumos Agrícolas. VISAR/ MAGA. **Guatemala.**

### E. Pesticidas organoclorados (OC)

Residuos de pesticidas pueden presentarse en casi todas las materias primas. Si una contaminación es detectada en el producto final no solo existe un riesgo en términos de seguridad alimentaria sino también alto impacto en la imagen de una marca especialmente en productos de alimentos infantiles.

Los pesticidas constituyen un grupo de más de 800 diversos químicos agrícolas comúnmente aplicados a plantas y animales a manera de controlar organismos indeseables, como malas hierbas, insectos, arañas, roedores, bacterias, hongos, parásitos y de allí la necesidad de asegurar la calidad y rendimiento de las cosechas.

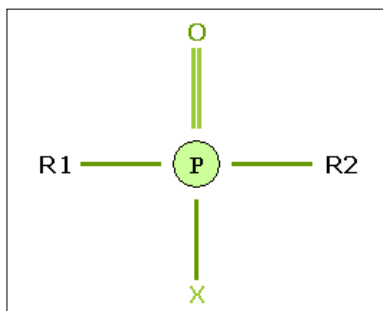
Sin embargo, los pesticidas son químicos dañinos de potencial riesgo para la salud de humanos si la exposición ocurre a niveles inapropiadamente altos. Pesticidas organoclorados (OC) e hidrocarburos clorados requieren especial atención. Son resistentes a la biodegradación lo cual resulta en alta persistencia ambiental y acumulación en la biósfera. Ellos incluyen al diclorodifeniltricloro-etano (DDT) y sus metabolitos (DDE), endrin (rodenticida), hexaclorobenceno (HCB, fungicida), lindano (HCH), aldrin, dieldrin, heptacloro y epóxido heptacloro. Su uso ha sido prohibido en muchos países hace más de 30 años. Sin embargo, debido a la acumulación en la biósfera, estos aún pueden ser encontrados en los alimentos.

Los pesticidas organoclorados son moléculas orgánicas cloradas de gran peso molecular y de estructura cíclica. Los pesticidas pueden contaminar materias primas de origen vegetal por la adherencia a la superficie, o vía absorción de la tierra (especialmente en vegetales de raíz o tubérculos) y agua. La probabilidad que un pesticida sea detectado en un alimento depende, además de las prácticas agrícolas, de su estabilidad química durante su procesamiento. Niveles en materias primas normalmente disminuyen con el tiempo y durante el procesamiento (e.g. lavado, pelado, cocción, etc.) Alimentos de origen animal son la mayor fuente dietética relacionada con la exposición de pesticidas OC, en raras ocasiones aceites vegetales pueden ser contaminados. Debido a su naturaleza lipofílica y resistencia a la biodegradación, los OC no solo se concentran sino se acumulan en la fracción lípida del cuerpo (leche y grasa animal, huevos). Como resultado de su prohibición en muchos países residuos de pesticidas en leche han disminuido. Sin embargo, la contaminación de OC en leche no se ha rechazado, especialmente en economías basadas en el pasto donde períodos de sequía o malnutrición pueden llevar a la movilización de OC de un cuerpo graso e incrementar su excreción en la leche.

## F. Pesticidas organofosforados

Los insecticidas organofosforados derivan del ácido fosfórico. Los insecticidas organofosforados (IOF) son los más utilizados en la actualidad y en menor grado los carbamatos. Ambos poseen acción anticolinesterásica.

Figura 2 Fórmula general de los compuestos organofosforados



Los insecticidas organofosforados se pueden clasificar según su fórmula general (Holmstedt), en cuatro categorías de acuerdo con el carácter del grupo X.

Categoría I: donde X contiene un nitrógeno cuaternario. Constituido por las fosforilcolinas. Son los más tóxicos. No se usan como insecticidas.

Categoría II: donde X es flúor. Constituido por los fluorofosfatos. Son muy volátiles. Usados como gases de guerra. El más representativo es el Sarín.

Categoría III: donde X es un grupo CN, OCN, SCN u otro halogenado que no sea flúor.

Categoría IV: donde X es otra molécula distinta de las anteriores. Incluye la mayoría de los compuestos utilizados como insecticidas. A su vez se subdividen en 8 subgrupos en relación con los sustituyentes R1 y R2.

A continuación propiedades del pesticida organofosforado clorpirifosetil, pesticida de interés.

Tabla 1 Propiedades físicas y químicas del clorpirifos etil

Pesticida	Estructura química	Fórmula química	Peso molecular	No. CAS
Clorpirifosetil		$C_9H_{11}Cl_3NO_3P$	350.59	2921-88-2

Tabla 2 Propiedades físicas y químicas del clorpirifos etil continuación

Pesticida	Nombre IUPAC	Sinónimos	Densidad relativa	Pto. ebullición	Pto. fusión
Clorpirifosetil	Ácido O, O dietil O-3,5,6-tricloro2-pinidil éster fosforotioico	Clorpirifos	a 1.398 a 43.5 °C	160 °C	41-42 °C

Tabla 3 Propiedades de solubilidad del clorpirifos etil

Pesticida	Solubilidad en agua	Soluble en	DL 50 <sup>(1)</sup>
Clorpirifosetil	Su solubilidad en agua es igual a 0.4 mg/L a 23 °C.	Acetona, benceno, cloroformo, metanol, disulfuro de carbono, dietil éter, xileno e iso-octanol.	96

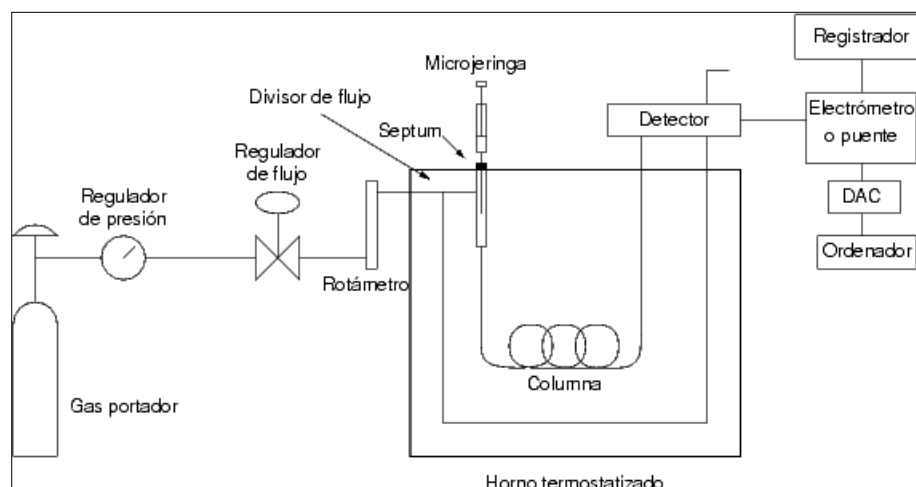
#### G. Generalidades de cromatografía de gases

La cromatografía de gases es una técnica cromatográfica de separación, identificación y cuantificación. Cromatografía de gases consiste en volatilizar la muestra e inyectarla en una columna cromatográfica. La elusión de los analitos presentes en la muestra se produce a través del flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, su única función es la de transportar el analito a través de la columna.

Existen dos tipos de cromatografía de gases (GC): la cromatografía gas-sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC), siendo esta última la que se utiliza más ampliamente y la de interés para este documento, se puede llamar simplemente cromatografía de gases (GC por sus siglas en inglés).

La GC se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases. Éste consta de diversos componentes básicos como el gas acarreador, el sistema de inyección de muestra, la columna y el detector.

Figura 3 Diagrama de un cromatógrafo de gases



El gas portador o acarreador tiene como función transportar los componentes de la muestra y crear una matriz adecuada para el detector.

Un gas acarreador debe reunir ciertas características: debe ser inerte para evitar interacciones (tanto con la muestra como con la fase estacionaria en la columna); fácilmente disponible, de alta pureza, y adecuado al detector a utilizar.

Se emplea hidrógeno como gas acarreador y nitrógeno como gas auxiliar. Adicionalmente, se cuenta con un sistema de manómetros y reguladores de flujo que garantizan un flujo estable. Así mismo, se tiene instalado un sistema de trampas para asegurar que la calidad de los gases es adecuada y así garantizar el buen funcionamiento de los cromatógrafos de gases.

La inyección de muestra se realiza empleando una microjeringa. La introducción de la muestra en la columna capilar es de forma rápida con el propósito de evitar el ensanchamiento de la banda de salida, la cual está sellada por una junta de goma de silicona llamada *septum*.

Figura 4 Inyector de muestra para un GC

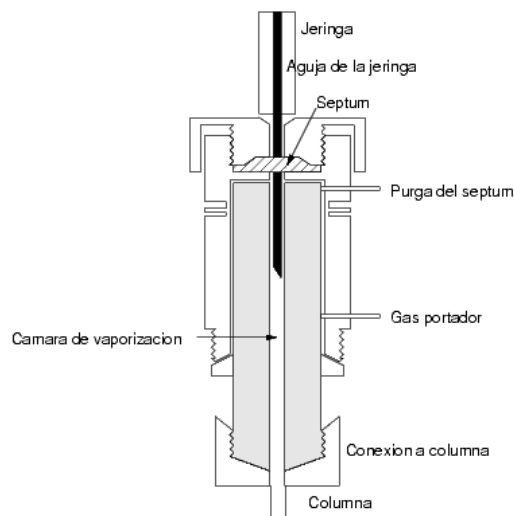
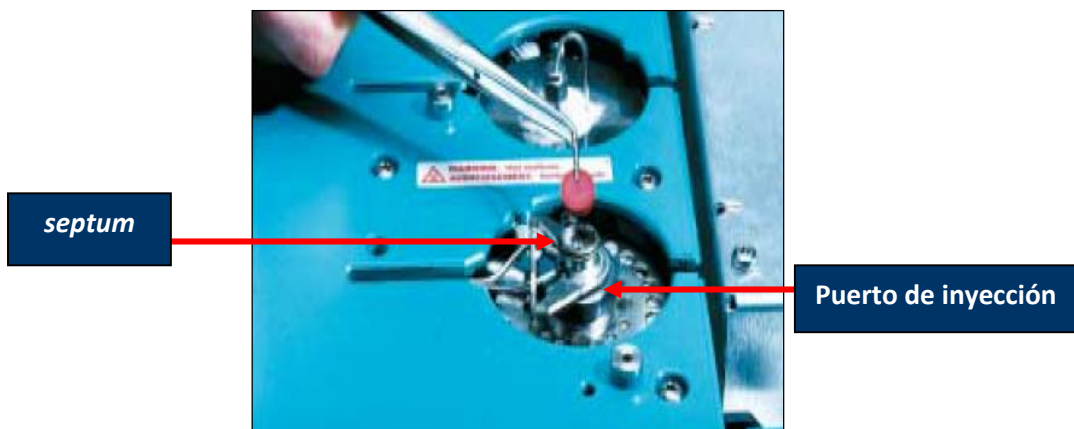
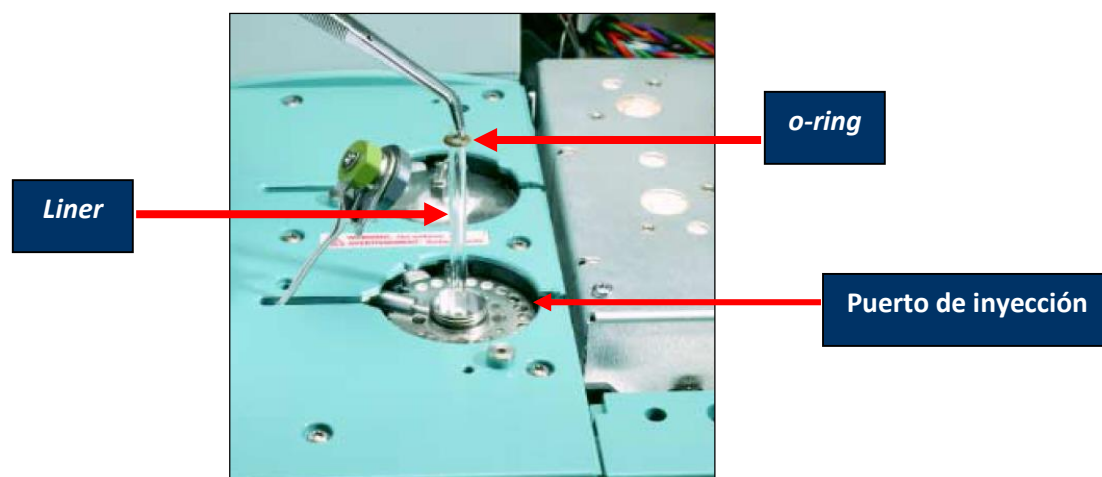


Figura 5 Puerto de inyección de un GC



Uno de los consumibles claves en la introducción de la muestra en el puerto de inyección es la *septum*. Toda columna debe mantener un sello libre de fugas y evitar la entrada de aire al puerto de inyección. La elección de las *septum* depende de los límites de temperatura a los cuales será sometida y al número de inyecciones que es capaz de soportar. Una *septum* dañada puede provocar pérdida de muestra, menor flujo de la columna, disminuir la vida de la columna y picos no asociados a la muestra (picos fantasma).

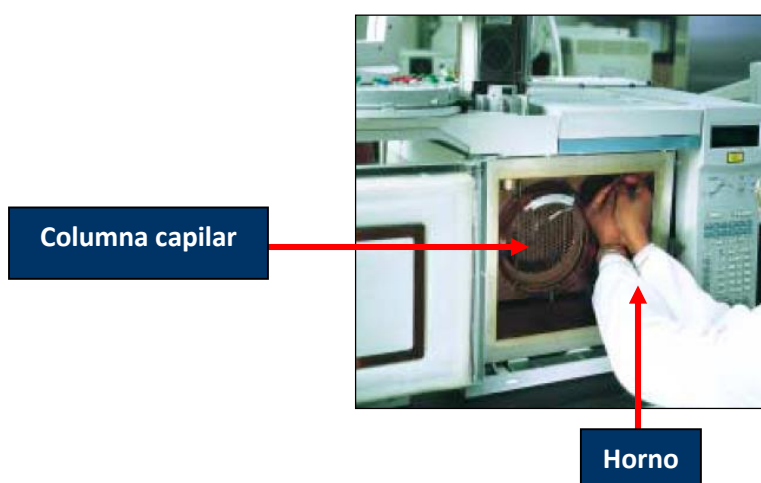
Figura 6 Consumibles dentro del puerto de inyección



El *liner* es el consumible dentro del puerto de inyección en el cual la muestra es evaporada y transformada a fase gaseosa. Los liners son sellados mediante un sello llamado o-ring fabricado de fluorocarbono, material más resistente a la deformación al ser sometido a altas temperaturas.

En GC se emplean dos tipos de columnas: las empaquetadas o de relleno y las tubulares abiertas o capilares. En este caso se emplearon columnas tipo capilares.

Figura 7 Columna Capilar y horno



La columna se encuentra dentro de una cavidad denominada horno, cuya función consiste en mantener la temperatura deseada, que dependiendo del programa nos puede interesar que permanezca constante, o bien que varíe de una forma u otra con el tiempo. La

temperatura es una variable importante, ya que de ella va a depender el grado de separación de los diferentes analitos.

El detector es el encargado de mostrarnos la salida de los componentes que fueron separados por la columna capilar, normalmente en gráficas en forma de picos. La elección del tipo de detector va a depender del tipo de analito a determinar.

1. Descripción del sistema. A continuación se describe la configuración del sistema cromatográfico empleado para la realización de este estudio:

Tabla 4 Configuración del sistema cromatográfico

Identificación	Componentes	Marca	Modelo
Sistema GC	Cromatógrafo de gases	Hewlett Parckard	6890
	Detectores FID-FPD	---	---
	Bandeja automuestreador	Hewlett Parckard	18596C
	Controlador	Agilent	G1512A
	2 Torretas de inyección 6890 series	Hewlett Parckard	G1513A

2. Auto muestreador líquido. El auto muestreador es el dispositivo que de forma automática mediante una programación previa permite introducir la muestra en solución dentro de la columna cromatográfica.

El auto muestreador líquido debe reunir una serie de características importantes, entre ellas:

- Manejo sencillo.
- Inerte y capaz de soportar altas presiones.
- Preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema.

a. *Componentes del auto muestreador líquido.* En la Tabla 5 se muestran los tres módulos que conforman el auto muestreador líquido *Agilent 7673AutomaticLiquidSampler*:

- Bandeja de muestras
- Módulo controlador
- Torrete de inyección

Tabla 5 Componentes del auto muestreador líquido

Componente	Modelo	Función	
Módulo de bandeja (brazo mecánico + bandeja de muestras)	18596C	El auto muestreador líquido trabaja en conjunto con <i>GC ChemstationSystem</i> para automatizar los procedimientos de inyección de muestra	
Módulo controlador	G1512A	Provee energía y comunicación entre el auto muestreador líquido y bandeja de muestras.	
Torreta de inyección	G1513A	Toma el volumen de la muestra dentro del vial y lo inyecta en el puerto de inyección	

3. Puerto de inyección. La función principal de los puertos de inyección dentro del sistema de cromatografía de gases es proveer una introducción de la muestra exacta, reproducible y predecible dentro de la columna. Existen diferentes tipos de puertos de inyección para columnas capilares, entre ellos: directo capilar (vaporizador), *split/splitless* (vaporizador), vaporizador de temperatura programada (PTV) y *cool-on-column* (no vaporiza).

Los puertos de inyección existentes son: *split*, *splitless* y *cool-on-column*. El puerto de inyección en modo *split* (dividido) ventea la mayoría de la muestra. El modo *splitless* (no dividido) transfiere la mayoría del volumen de la muestra a la columna. En el caso del puerto *cool-on-column*, la muestra es introducida a temperatura ambiente sin vaporizarla dentro del puerto de inyección.

4. Detectores. El dispositivo que monitorea la presencia de un soluto cuando sale de la columna es esencial para todos los instrumentos de cromatografía. A este dispositivo de monitoreo se le ha nombrado de manera general como detector. El detector es la parte del equipo que permite ver y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de un compuesto a la salida de la columna cromatográfica.

Tabla 6 Principales características de un detector ideal

Criterio	Observación
Sensibilidad	Capacidad de determinar y diferenciar con precisión cuando el gas portador se conduce solo y cuando lleva un analito.
Respuesta lineal al analito	Respuesta del detector proporcional a la concentración del analito
Tiempo de respuesta corto	Independiente del caudal de salida.
Intervalo de temperatura de trabajo amplio	Temperaturas típicas de trabajo. Por ejemplo, desde temperatura ambiente hasta unos 350-400° C.
Alta fiabilidad y manejo sencillo	Robusto
Respuesta selectiva y altamente predecible	Para un reducido número de analitos.

a. *Tipos de detectores.* El cromatógrafo de gases puede disponer de varios sistemas de detección. En la tabla 7 se listan algunos tipos de detectores y una breve descripción de los mismos.

Tabla 7 Tipos de detectores existentes

Nombre	Sensibilidad	Responde a	Comentarios
Ionización de llama, FID	Alta	Casi todos los compuestos orgánicos.	El “detector universal” para compuestos orgánicos.
Captura de electrones, ECD	Muy alta	Rango limitado de componentes, la mayoría halocarburos.	Utilizado para el análisis de pesticidas y herbicidas clorados a nivel de trazas.
Detector fotométrico de llama, FPD	Muy alta	Componentes con fósforo.	Uso en análisis de pesticidas fosforados.
Masas, MSD	Muy alta	Determinación de la composición elemental de una muestra o molécula.	Técnica con propósitos cualitativos y cuantitativos

b. *Detector fotométrico de llama, FPD.* El detector fotométrico de llama (FPD) se ha utilizado extensamente para el análisis de contaminantes del aire y del agua como pesticidas e hidrocarburos. Se trata de un detector selectivo, sensible a los compuestos que contienen azufre y fósforo. En este detector, la muestra se quema dentro de una llama rica en hidrógeno donde algunas especies se reducen y excitan. El flujo de gas mueve las especies excitadas a una zona de emisión más fría sobre la llama donde decae su energía y emite luz. Un angosto filtro de banda selecciona la luz correspondiente a una única especie, mientras que un escudo previene que la emisión intensa de carbono alcance el tubo foto multiplicador (TFM).

Esta luz emitida choca contra una superficie fotosensible en el TFM mientras pierde un electrón. El electrón es amplificado dentro del TFM con una ganancia cercana a un millón. La corriente del TFM es amplificada y digitalizada por la tarjeta electrónica del FPD. La señal de voltaje se identifica bajo el nombre de output.

### III. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad ha cobrado más relevancia para la industria de alimentos que el contenido de residuos de pesticidas en los alimentos cumpla con las legislaciones que le aplican. Esto con el propósito de fortalecer el comercio globalizado. En caso, las determinaciones de residuos de pesticidas se encuentren fuera de las legislaciones internacionales o locales puede tener un impacto negativo no solo en la salud del consumidor, sino también, en la imagen de la marca frente al consumidor.

Se están realizando esfuerzos por parte de compañías involucradas en el negocio de alimentos para fortalecer la capacidad de sus laboratorios a incrementar su *screening* de pesticidas, disminuir límites de detección y tiempos de análisis.

De lo anterior mencionado, se puede evidenciar la relevancia de generar resultados confiables dentro de las rutinas de análisis en los laboratorios de aseguramiento de la calidad. Es común solicitar que las metodologías de análisis se encuentren acreditadas por un ente reconocido. Previo a una acreditación de un método, este debe ser verificado dentro del laboratorio empleando una metodología validada por una entidad reconocida. Todo esto para garantizar la confiabilidad y veracidad de los resultados del método dentro del laboratorio. La verificación de un método involucra la evaluación de diferentes parámetros y que los mismos cumplan con los rangos aceptables.

Este estudio presenta los resultados obtenidos en la verificación del pesticida organofosforado clorpirifos etil en la matriz no grasa, harina de trigo, empleando cromatografía de gases configurado con un detector FPD dentro de las instalaciones de un laboratorio de aseguramiento de la calidad analítica para servicio de una industria de alimentos.

## IV. OBJETIVOS

### A. Objetivo general

Validación de la Metodología para la Determinación de Multiresiduos de Pesticidas Organofosforados, Organoclorados y Piretroides en Alimentos Grasos y no Grasos por Cromatografía de Gas Empleando Doble Detectores de Captura de Electrones (ECD) y Detector Fotométrico de Llama (FPD)

### B. Objetivos específicos

1. Llevar a cabo una curva de varios puntos para determinar la correlación entre concentración y respuesta del detector.
2. Determinar los límites de detección y cuantificación para el clorpirifos etil en el sistema de cromatografía empleado.
3. Verificar la exactitud y precisión del método a través del uso de materiales de referencia en haría de trigo.
4. Determinar la incertidumbre del método.

## V. METODOLOGÍA

El procedimiento de análisis para alimentos no grasos está basado en *CEN European Standard EN 12393:1998*. Para alimentos grasos la metodología fue validada en colaboración con la División Química de Alimentos de la Sociedad Alemana (*Gesellschaft Deutscher Chemiker, GDCh*).

El método se basa en la estandarización de las condiciones de extracción de las muestras que difieren en contenido de agua.

El principio del método consiste en que los pesticidas presentes en alimentos grasos, no grasos o secos son extraídos con acetona (luego de la adición apropiada de agua para asegurar una relación constante de acetona:agua de 2:1 v/v) seguido de una partición en ciclohexano:acetato de etilo (1 + 1). Las grasas y aceites vegetales y animales son directamente disueltas en ciclohexano:acetato de etilo (1 + 1).

La fase orgánica es concentrada y limpiada por cromatografía de permeación en gel (GPC) en este caso gel de poliestireno, empleando la mezcla de ciclohexano y acetato de etilo como eluyente. La fracción que contiene los multiresiduos de pesticidas organofosforados son concentrados y analizados por cromatografía de gas con detección fotométrica de llama. En el caso del análisis de multiresiduos de pesticidas organoclorados y piretroides por detección de captura de electrones, es indispensable una limpieza por minicolumnas de silicagel. En este paso de limpieza, los compuestos son separados en diversas fracciones adicionales a manera de ayudar en la identificación.

Algunas limitaciones o interferencias a encontrar y sobrepasar consiste en que al emplear un detector de captura de electrones (ECD) es importante confirmar que el detector se encuentra operando en rango lineal, el cual es dependiente de cada pesticida y su correspondiente tiempo de retención. El rango lineal es también dependiente del tipo de detector. De allí que siempre deba inyectarse volúmenes de muestra y estándares de referencia dentro del rango lineal.

Los requerimientos analíticos necesarios para la validación del método y que el laboratorio pueda emplear correctamente el método como rutina de trabajo incluyen:

1. Confirmación de la identidad y selectividad
2. Linealidad
3. Límite de detección y límite de cuantificación
4. Precisión

## 5. Exactitud

## 6. Incertidumbre

### A. Confirmación de la identidad y selectividad

La confirmación de la identidad significa chequear que la señal producida a ser medida corresponde al analito.

Selectividad se refiere a la habilidad del método para distinguir entre un analito y otra sustancia presente en la matriz.

La identificación de un pico desconocido en un cromatograma es logrado mediante la comparación de su tiempo de retención con una solución estándar.

### B. Linealidad

La linealidad define la habilidad del método para obtener del equipo una respuesta proporcional a la concentración del analito. Los límites de la linealidad son las concentraciones entre las cuales el modelo de calibración puede ser aplicada linealmente.

Si no es posible alcanzar un comportamiento lineal pueden intentarse otros modelos.

### C. Límite de detección y cuantificación

El límite de detección se define como la concentración mínima de un residuo de pesticida (mg/kg) puede ser detectada con una certeza aceptable, sin embargo no es posible cuantificarlo con una precisión aceptable. El límite de detección es, por supuesto, altamente dependiente del tipo de columna, temperatura, gas acarreador, tipo de detector, etc. Como regla general, el límite de detección corresponde a la cantidad de analito que genera una respuesta tres veces mayor que el nivel de ruido dentro del sistema de detección.

El límite de cuantificación se define como la concentración del residuo de pesticida (mg/kg) que corresponde a la medida más pequeña de la altura del pico en el cromatograma con un aceptable grado de confianza en el resultado. El límite de cuantificación depende del grado de pureza, del tipo de matriz, de las condiciones cromatográficas, etc. Como regla general, el límite de cuantificación para un dado residuo de pesticida debe ser al menos una décima de su correspondiente límite máximo

residual aceptable por la legislación. Sin embargo, si el límite máximo residual es 0.05 mg/kg o menos, un límite de cuantificación de un quinto de este valor es suficiente.

#### D. Precisión

Precisión en la cercanía entre resultados de evaluación independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas.

Repetibilidad (r) corresponde a la precisión bajo condiciones de repetibilidad. Representa la variabilidad de los resultados esperada cuando un método se realiza por un solo analista empleando un mismo equipo dentro un corto intervalo de tiempo, por ejemplo, la variabilidad entre resultados cuando la muestra es analizada en duplicado.

La diferencia absoluta entre dos resultados obtenidos empleando el mismo método en el mismo material evaluado, en el mismo laboratorio, por el mismo analista, empleando el mismo equipo dentro de un corto intervalo de tiempo, no debe ser mayor que el deducido por la interpolación log-log de los datos a continuación:

Tabla 8 Límites de repetibilidad

Nivel Residual	Diferencia ( $\pm$ )
0.010 mg/kg	0.005 mg/kg
0.100 mg/kg	0.025 mg/kg
1.000 mg/kg	0.125 mg/kg

Reproducibilidad intermedia (iR) representa la variabilidad de resultados independientes obtenido por diferentes analistas, con escalas de tiempo extendidas, empleando diferente equipo entre diferentes laboratorios.

Reproducibilidad (R) representa la variabilidad de resultados independientes obtenidos por diferentes laboratorios, en diferentes días, con diferentes analistas, empleando diferentes calibraciones y equipos (variaciones entre laboratorios) (referencia)

La precisión puede ser expresada con una desviación estándar o como un límite. Hacer uso de medidas relativas – desviación estándar relativa o un límite relativo – también es posible. En este caso se emplearán límites con valores absolutos.

La diferencia absoluta entre dos resultados obtenidos empleando el mismo método en el mismo material evaluado, en diferentes laboratorios, por diferentes analistas, empleando diferentes equipos no debe ser mayor que el deducido por la interpolación log-log de los datos a continuación:

Tabla 9 Límites de reproducibilidad

Nivel Residual	Diferencia ( $\pm$ )
0.01 mg/kg	0.01 mg/kg
0.10 mg/kg	0.05 mg/kg
1.00 mg/kg	0.25 mg/kg

#### E. Exactitud

La exactitud representa la cercanía entre un valor promedio obtenido de una serie de resultados y el valor de referencia. Una muestra de referencia podría ser: una matriz a la que se adiciona el analito de interés o un material de referencia certificado.

El rango aceptable de recuperación se encuentre entre 70 – 110% para todos los pesticidas añadidos cercanos al nivel de límite máximo residual. Sin embargo, en recuperaciones de rutina según lineamientos de la Unión Europea es aceptable un rango de 60-140%. (SANCO/12571/2013 19 Noviembre 2013)

Con el fin de evaluar la linealidad de la respuesta del analito en el detector se prepara una curva de calibración de seis puntos o concentraciones cuya preparación de detalla a continuación.

Las buenas prácticas empleadas en la preparación de soluciones estándares de pesticidas y su almacenamiento constituyen un punto crítico en el proceso analítico.

#### F. Preparación de las soluciones estándar de pesticidas

- **Equipo:** para pesar los estándares utilice una balanza analítica. Se almacenan las soluciones estándar de pesticidas en el congelador a  $-18 \pm 2$  °C o en la refrigeradora a  $4 \pm 2$  °C, según corresponda.
- **Cristalería:** se utiliza únicamente cristalería de vidrio clase A. Toda la cristalería, por ejemplo, balones aforados, pipetas volumétricas, pipetas *pasteur* de vidrio, espátulas de metal y frascos ámbar, empleados en la preparación de estándares de pesticidas previamente descontaminada con bencina de petróleo. La descontaminación se realiza antes y después del uso de la cristalería para evitar cualquier impureza y contaminación.
- **Solventes:** los solventes utilizados en la preparación de soluciones estándares de pesticidas deben ser seleccionados de acuerdo a la solubilidad y estabilidad de los pesticidas, así mismo, y deben ser de grado para análisis de residuos.

Se emplea tolueno grado análisis de residuos para la preparación de estándares de pesticidas organoclorados, policlorobifenilos, organofosforados y piretroides; y metanol para pesticidas carbamatos.

- **Estándares de pesticidas:** utilizar estándares tipo “*neat*” en estado sólido o líquido de calidad traceable como estándares para análisis de residuos.

#### G. Equipo y medidas de seguridad

- Utilizar bata, guantes de nitrilo, mascarilla y anteojos o careta de seguridad.
- Las soluciones A1 de pesticidas y sus diluciones, deben ser preparadas en campanas de extracción localizadas en el área de extracción de pesticidas.
- En caso de derrame, limpie el área afectada con el solvente del mismo tipo en que se encuentra disuelto el pesticida. Descontamine el área con bencina de petróleo y remueva el solvente utilizando toallas de papel. Todos los materiales utilizados para la limpieza del derrame deben ser descartados en el recipiente específico para desechos a incinerar por el servicio tercerizado.

#### H. Preparación de mezclas de trabajo de estándares de pesticidas

- **Soluciones individuales de estándares de pesticidas A1 (1mg/ml):**

Calcule la cantidad de estándar a pesar en función de su porcentaje de pureza

$$\frac{\text{mg de estándar de pesticida}}{(\% \text{ de pureza}) / 100 \%}$$

Independientemente de la cantidad de estándar de pesticida utilizado, pese con precisión y mantenga la relación p/v para que la concentración de la solución A1 sea de 1mg/ml.

*Por ejemplo: para preparar una solución de concentración de 1mg/ml de hexaclorobenceno, el cual de acuerdo a su certificado de análisis tiene un porcentaje de pureza de 98%, la cantidad a pesar se calcula como sigue:*

*Si se utiliza un balón aforado de 20ml*

$$\frac{20\text{mg}}{98\%/100\%} = \frac{20 \text{ mg}}{0.98} = 20.41\text{mg de hexaclorobenceno}$$

- **Soluciones diluidas:** a partir de las soluciones A1 se realizan las diferentes mezclas de pesticidas y diluciones para realizar la curva de calibración y las soluciones para marcar tiempos de retención de los picos de estándares. En caso de conocer el orden de elución o tiempos de retención en las diferentes columnas no es necesario prepararlas.

Solución DP: agregue 1 mililitro de la solución A1 en un balón de 20ml y afore con solvente según corresponda (se obtiene una concentración de 50ng/μl).

Solución TR: agregue 1 mililitro de la solución DP en un balón de 20ml y afore con solvente según corresponda (se obtiene una concentración de 1ng/μl).

Solución DI: agregue 2 mililitros de la solución DP en un balón de 50ml y afore con el solvente según corresponda (se obtiene una concentración de 2ng/μl).

Solución DF: o nivel 1 de la curva de calibración. Agregue 5ml de solución DI en un balón de 100ml y afore con el solvente según corresponda (se obtiene una concentración de 100pg/μl).

*Nota: Los códigos de las soluciones preparadas siempre van a corresponder a la misma concentración. La solución TR es empleada con el objeto de marcar tiempos de retención de los picos de cada pesticida. En el caso de conocer el orden de elución o tiempo de retención en las diferentes columnas, no es necesario prepararlas.*

- **Mezclas de trabajo:** se realizan mediante diluciones a partir de las soluciones A1 de los estándares individuales de pesticidas. A continuación se lista los componentes de pesticidas en la mezclas empleadas.
- **PHOS 2:** mezcla de pesticidas fosforados que se inyecta en los detectores FPD. Contiene los siguientes pesticidas:  
azinfosetil, azinfosmetil, clorpirifosetil, clorpirifosmetil, disulfotón, etoprofos, fenclorfos, metacrifos, tetraclorvinfos, metamidofós, clorfenvinfos, etrimfos, formotión, fosmet, fosfamidón, diclorfos, e isofenfos (etil).

*Nota: las diluciones necesarias para la preparación de las mismas se describen en el anexo 1.*

Para pesar los estándares de pesticidas, se debe utilizar una espátula metálica para los que se encuentran en estado sólido y una pipeta *pasteur* para los que se encuentran en estado líquido.

Al terminar de preparar las soluciones, trasvase el contenido de los balones a frascos ámbar para prevenir problemas de degradación debido a la luz.

Coloque a cada frasco de solución estándar preparado, una etiqueta que contenga la siguiente información: nombre del compuesto, concentración, fecha de preparación, fecha de vencimiento, analista y condiciones de almacenamiento.

Así mismo, anotar los datos correspondientes a la trazabilidad de soluciones A1 preparadas empleando la correspondiente hoja de registro para estándares de pesticidas.

Antes de utilizar una solución de estándar preparada debe sacarla del congelador y llevarla a temperatura ambiente.

#### I. Almacenamiento de estándares de pesticidas y soluciones preparadas

Los estándares certificados pueden adquirirse como sólidos cristalinos, líquidos o soluciones preparadas en solventes orgánicos. Para garantizar su estabilidad declarada en el certificado de calidad, los estándares puros deben ser almacenados de acuerdo a las condiciones que especifica el fabricante. Los estándares de pesticidas pueden encontrarse almacenados en el gabinete de pesticidas, el cual debe permanecer bajo llave, así como en condiciones de refrigeración y congelación.

Tabla 10 Preparación de la solución madre de la mezcla de pesticidas

Pesticida	Solución A1	Solución DP	Solución DI	Solución DF
-----------	-------------	-------------	-------------	-------------

		(50 ng / $\mu$ l)	(2 ng/ $\mu$ l)	(100 pg/ $\mu$ l)
Azinfosetil	1 mg/ml	1 ml A1/20 ml	2 ml DP/50 ml	5 ml DI/100 ml
Azinfosmetil	1 mg/ml	1 ml A1/ 20 ml	2 ml DP/50 ml	5 ml DI/100 ml
Clorpirifosetil	1 mg/ml	1 ml A1/ 20 ml	2 ml DP/50 ml	5 ml DI/100 ml
Clorpirifosmetil	1 mg/ml	1 ml A1/ 20 ml	2 ml DP/50 ml	5 ml DI/100 ml
Disulfotón	1 mg/ml	1 ml A1/ 20 ml	2 ml DP/50 ml	5 ml DI/100 ml
Etoprofos	1 mg/ml	1 ml A1/ 20 ml	2 ml DP/50 ml	5 ml DI/100 ml
Fenclorfos	1 mg/ml	1 ml A1/ 20 ml	2 ml DP/50 ml	5 ml DI/100 ml
Metacrifos	1 mg/ml	1 ml A1/ 20 ml	2 ml DP/50 ml	5 ml DI/100 ml
Tetraclorvinfos	1 mg/ml	1 ml A1/ 20 ml	2 ml DP/50 ml	5 ml DI/100 ml
Metamidofós	1 mg/ml	1 ml A1/ 20 ml	2 ml DP/50 ml	5 ml DI/100 ml
Clorfenvinfos	1 mg/ml	1 ml A1/ 20 ml	2 ml DP/50 ml	5 ml DI/100 ml
Etrimfos	1 mg/ml	1 ml A1/ 20 ml	2 ml DP/50 ml	5 ml DI/100 ml
Formotión	1 mg/ml	1 ml A1/ 20 ml	2 ml DP/50 ml	5 ml DI/100 ml
Fosmet	1 mg/ml	1 ml A1/ 20 ml	2 ml DP/50 ml	5 ml DI/100 ml
Fosfamidón	1 mg/ml	1 ml A1/ 20 ml	2 ml DP/50 ml	5 ml DI/100 ml
Diclorfos	1 mg/ml	1 ml A1/ 20 ml	2 ml DP/50 ml	5 ml DI/100 ml
Isofenfos (etil)	1 mg/ml	1 ml A1/ 20 ml	2 ml DP/50 ml	5 ml DI/100 ml

#### J. Preparación de curva de calibración

Las curvas de calibración de estándares de pesticidas constan de seis niveles de calibración, los cuales tienen las siguientes concentraciones:

Tabla 11 Curva de calibración para la mezcla de pesticidas

Nivel 1:	100pg/ $\mu$ l
Nivel 2:	75 pg/ $\mu$ l
Nivel 3:	50 pg/ $\mu$ l
Nivel 4:	25 pg/ $\mu$ l
Nivel 5:	10 pg/ $\mu$ l
Nivel 6:	05 pg/ $\mu$ l

*Ejemplo para realizar la curva de calibración de las diferentes mezclas de estándares de pesticidas: a partir de la solución DF o nivel 1 de la curva de calibración tomar:*

Tabla 12 Preparación de la curva de calibración

Solución	Curva de Calibración
----------	----------------------

	(Concentración)
Nivel 2	15 ml DF/20 ml (75 pg/ $\mu$ l)
Nivel 3	10 ml DF/20 ml (50pg/ $\mu$ l)
Nivel 4	5 ml DF/20 ml (25pg/ $\mu$ l)
Nivel 5	2 ml DF/20 ml (10pg/ $\mu$ l)
Nivel 6	1 ml DF/20 ml (5 pg/ $\mu$ l)

## VI. RESULTADOS

A continuación se detallan los resultados obtenidos de las pruebas experimentales en la determinación de clorpirifos etil en harina de trigo.

Tabla 13 Curva de calibración

#	Independent variable (concentration)	Dependent variable (response)
1	6.070	55.525
2	12.137	73.801
3	30.347	170.660
4	60.695	333.950
5	91.043	493.170
6	121.390	661.580

Tabla 14 Regresión lineal

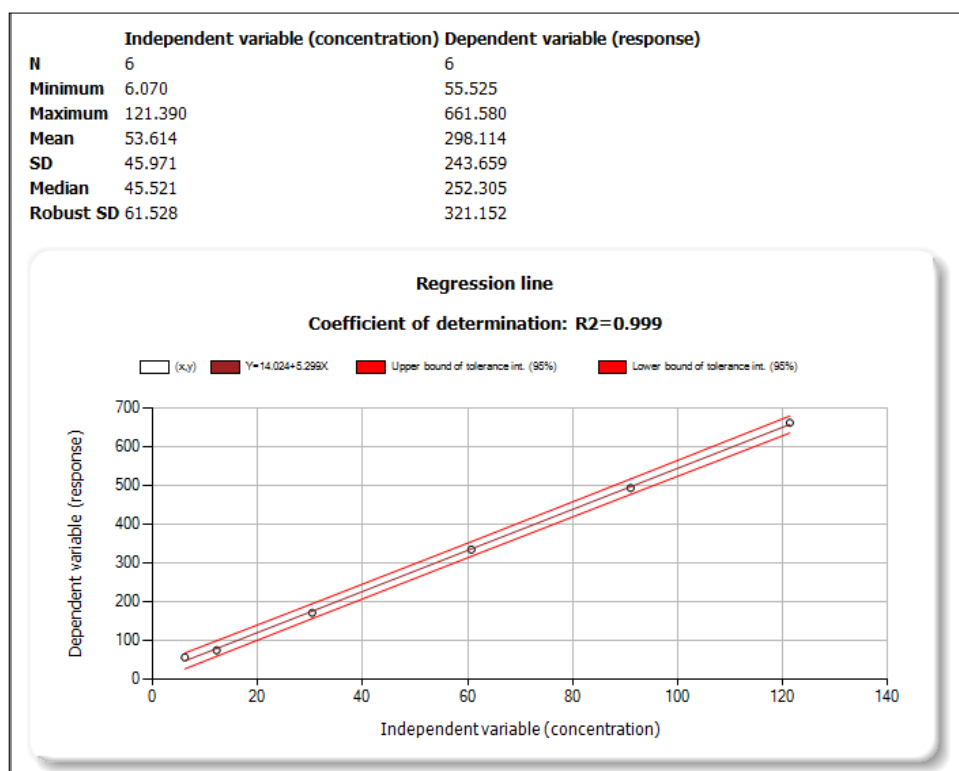


Tabla 15 Resultados de la exactitud

Datos muestras de valor de referencia	Diseño para determinar exactitud	Datos																																										
<u>Parameters of the reference sample</u> Reference Value : 163.5 Uncertainty : 12.06 Unit : ug/kg	<u>Executive summary</u> Number of replicates : 2 Number of replicate series : 6 Number of deleted series : 0	<u>Data</u> <table border="1"> <thead> <tr> <th>#</th> <th>Sample</th> <th>Rep 1</th> <th>Rep 2</th> <th>Average</th> <th>SD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>2</td> <td>119.00</td> <td>166.00</td> <td>142.50</td> <td>33.23</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>3</td> <td>168.00</td> <td>183.00</td> <td>175.50</td> <td>10.61</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>4</td> <td>161.00</td> <td>171.00</td> <td>166.00</td> <td>7.07</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>5</td> <td>146.00</td> <td>146.00</td> <td>146.00</td> <td>0.00</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>6</td> <td>161.00</td> <td>174.00</td> <td>167.50</td> <td>9.19</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>7</td> <td>169.00</td> <td>162.00</td> <td>165.50</td> <td>4.95</td> </tr> </tbody> </table>	#	Sample	Rep 1	Rep 2	Average	SD	1	2	119.00	166.00	142.50	33.23	2	3	168.00	183.00	175.50	10.61	3	4	161.00	171.00	166.00	7.07	4	5	146.00	146.00	146.00	0.00	5	6	161.00	174.00	167.50	9.19	6	7	169.00	162.00	165.50	4.95
#	Sample	Rep 1	Rep 2	Average	SD																																							
1	2	119.00	166.00	142.50	33.23																																							
2	3	168.00	183.00	175.50	10.61																																							
3	4	161.00	171.00	166.00	7.07																																							
4	5	146.00	146.00	146.00	0.00																																							
5	6	161.00	174.00	167.50	9.19																																							
6	7	169.00	162.00	165.50	4.95																																							

Tabla 16 Porcentaje de recuperación

Pesticida	Resultado (µg/kg)	Porcentaje de recuperación (%)	Comparación de medias
Clorpirifosetil	165.8	101.4%	No hay diferencia

Tabla 17 Conclusión de la recuperación experimental

<u>Recovery analysis conclusion</u>		
	Robust	Classical
Median / Mean of results	165.750	160.500
Standard Deviation	11.926	13.142
Recovery	101.4%	98.2%
SD(Recovery)	0.080	0.079
t test	0.171	0.231
p value	0.871	0.827
SD(Rec)corrected	0.080	0.079
RSD(Rec)corrected	7.9%	8.1%
<b>Conclusion : The recovery is NOT different from 100% (at 95% confidence interval).</b>		

Tabla 18 Resultados en la determinación de precisión

General	<b>Robust</b>
Standard deviation of the mean of replicates (SD(b))	165.75
	11.93
<b>Repeatability Results</b>	
Standard deviation of repeatability SD(r)	12.06
Relative standard deviation of repeatability RSD(r) or CV(r)	7.3%
Repeatability limit at 95% (r) for duplicate results	33.42
Relative repeatability limit at 95% (r%) for duplicate results	20.2%
<b>Intermediate reproducibility Results</b>	
Standard deviation of intermediate reproducibility SD(iR)	14.66
Relative standard deviation of intermediate reproducibility RSD(iR) or CV(iR)	8.8%
Intermediate reproducibility limit at 95% (iR) for duplicate results	40.64
Relative intermediate reproducibility limit at 95% (iR%) for duplicate results	24.5%

Tabla 19 Resultados en la determinación de incertidumbre del método

<b><u>Measurement uncertainty</u></b>	
Median	165.75
Precision contribution : CV(iR)	8.84%
Recovery contribution : RSD(Rec)corrected	7.94%
Standard uncertainty : u	19.70
Relative standard uncertainty : Relative u	11.89%
Expanded uncertainty : U	165.75 ± 39.40
Relative expanded uncertainty : Relative U	165.75 ± 23.77%

## VII. DISCUSIÓN

Como se detalla en la sección de la metodología, los requerimientos analíticos para la verificación de un método incluyen seis parámetros. Estos pasos incluyen: confirmación de la identidad y selectividad del analito de interés, determinación de la linealidad, límite de detección y límite de cuantificación, determinación de la precisión, exactitud e incertidumbre del método. En este caso se estará realizando una verificación del método, pues se está partiendo de una metodología previamente validada por una entidad reconocida.

En este estudio la identidad y selectividad del analito de interés se realizó empleando una mezcla de estándares organofosforados preparados a partir de un estándar certificado y diluido a seis diferentes concentraciones. La identidad se calcula mediante comparación del tiempo de retención. La concentración más alta de la curva con 100 ppb's es la utilizada para determinar la identidad del clorpirifos etil. En la sección de Anexos en la gráfica con título Figura 8, se muestran los tiempos de retención de pesticidas organofosforados, entre ellos el clorpirifos etil, con tiempo de retención de 13.729 minutos.

La herramienta estadística empleada para la evaluación de los resultados del estudio fue Q-Stat, software desarrollado por la compañía y propiedad privada de la misma. Esto con el propósito de estandarizar los cálculos estadísticos no importando la ubicación del laboratorio dentro de la compañía.

El segundo paso en la validación del método es la determinación de la linealidad en la respuesta del detector FPD o detector fotométrico de llama empleando seis puntos de concentración desde 5ppb hasta 100ppb. En la sección de Datos, cálculos y resultados se muestra en las Tablas 13 y 14 se muestran los resultados de los mismos. El coeficiente de correlación lineal mínimo aceptable es de 0.9, según estándares internos. El coeficiente de correlación lineal, comúnmente llamado R<sup>2</sup>, obtenido experimentalmente fue de 0.999. Esto indica que la respuesta del detector FPD dentro del

rango de 5 ppb a 100 ppb es lineal. Los puntos objetivos de la curva fueron: 5, 10, 25, 50, 75 y 100 ppb, que corregidos por la pureza y peso empleados fueron finalmente: 6, 12, 30, 60, 91 y 121 ppb, respectivamente.

El límite de detección debe ser comparado con la línea base y el mismo debe cumplir con ser tres veces la desviación estándar respecto a la línea base. Por otra parte el límite de cuantificación debe ser diez veces la desviación estándar respecto a la línea base. Con ayuda del software ChemStation que poseen los cromatógrafos de gases y empleando un tipo de reporte extendido se determinó que el límite de detección es de 10 ppb y el límite de cuantificación 25 ppb's.

Cabe mencionar en este momento, que instrumentos con niveles de detección más bajos pueden ser alcanzados con modelos de cromatógrafos más actuales y empleando espectrometría de masas.

La precisión de un procedimiento analítico expresa la cercanía de los valores obtenidos al ser comparados los valores de la serie de datos experimentales. Importante es que la muestra sea homogénea para evitar introducir factores que influyan en la dispersión de los datos. La muestra de referencia fue adquirida de la empresa FAPAS en Inglaterra, es la compañía quien se asegura la homogeneidad da la matriz.

En la estudio se empleó la matriz alimenticia no grasa harina de trigo, con un valor de referencia de 163.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , con una incertidumbre de 12.06 según el certificado de análisis de la empresa FAPAS en Inglaterra de donde se realizó la compra.

Según los lineamientos aceptados por la SANCO/12571/20136 la determinación de una validación debe realizarse con al menos seis replicados en duplicado, en diferentes días. Según se muestra en la Tabla 15, se puede evidenciar una disminución en la dispersión de los resultados con el avanzar del tiempo. Esto debido al mejor dominio y experiencia que se adquiere con el tiempo por parte de los analistas. El valor inicial de la desviación estándar fue de 33.23 unidades y se redujo hasta 4.95 unidades en la sexta réplica. Este comportamiento en los resultados es normal y es el esperado. Por tal razón, los resultados experimentales en cuanto a precisión son aceptables, al haber obtenido una

reproducibilidad intermedia de 8.8%, debido a que las determinaciones se realizaron en días diferentes.

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la cercanía del valor obtenido comparado con el valor aceptado o adicionado. En la Tabla 16, se muestran los resultados de la evaluación de exactitud. El resultado experimental fue de 165.8µg/kg contra el valor de referencia 163.5µg/kg, esto indica un 101% de recuperación. La evaluación estadística arrojó como conclusión que la recuperación no es diferente del valor de referencia a un intervalo de confianza del 95%.

Por último, se determinó la incertidumbre del método empleando la herramienta Q-Stat dando como resultado que la incertidumbre expandida es de  $165.75 \pm 39.40$  y la incertidumbre relativa expandida es  $165.75 \pm 23.77\%$ . Este valor nos indica las unidades en la que el resultado absoluto puede oscilar.

Una vez se cuenta con todos los parámetros dentro de los rangos aceptables se procede a crear una carpeta de verificación con un resumen de todos los parámetros. Esta carpeta es útil para la posterior acreditación del método que en el caso de Guatemala, la Organización a cargo es la Organización Guatemalteca de Acreditación, por sus siglas en español OGA.

## VIII. CONCLUSIONES

La curva de calibración de seis puntos o concentraciones para clorpirifos etil empleando un detector fotométrico de llama (FPD) cumple con los parámetros establecidos para ser cuantificado con una regresión lineal, cuyo coeficiente de correlación,  $R^2 = 0.999$ .

El límite de detección es  $10\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb) y el límite de cuantificación es  $25\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb).

Se cumple la determinación de exactitud del método de acuerdo a cálculos estadísticos de diferencias de medias, la recuperación no es diferente entre datos experimentales y valores de referencia.

Se cumple con la determinación de exactitud del método, obteniendo como valor experimental  $163.5\mu\text{g}/\text{kg}$ , correspondiente a un 101% de recuperación. La recuperación experimental no es diferente del valor de referencia a un intervalo de confianza del 95%.

Cumple con los rangos aceptables de precisión entre diferentes resultados con desviaciones estándar menores a 8.8%.

El valor de incertidumbre expandida es  $165.75\mu\text{g}/\text{kg} \pm 39.40$  y la incertidumbre relativa expandida es  $165.75\mu\text{g}/\text{kg} \pm 23.77\%$ .

El método es apto para determinar cuantificaciones cuantitativas para el pesticida clorpirifos etil en harina de trigo.

## IX. RECOMENDACIONES

Se recomienda extender el alcance de la determinación para otras matrices alimentarias y extender el *screening* de pesticidas del método.

De ser las exigencias más estrictas en cuanto a niveles de detección menores a 10 ppb y cuantificación de 25 ppb, se recomienda emplear cromatógrafos más modernos y/o en conjunto con espectrometría de masas.

Una vez, se cuenta con el cumplimiento de los parámetros de verificación se puede solicitar la acreditación del método por parte de la OGA.

## X. BIBLIOGRAFÍA

1. CP-31.521-1 *Guidance levels for contaminants in finished products*. Febrero 2006. (Confidencial)
2. *European Commission. Food Safety. Plants. Pesticides*. Citado en línea en: [http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/index_en.htm)
3. GI-00.940-3 *Guidelines for the validation and verification of analytical methods. Quantitative chemical methods*. Marzo 2010. (Confidencial)
4. GI-00.941. *Validation and verification of qualitative chemical analytical methods. Marzo 2011*. (Confidencial)
5. *Global Contaminants Surveillance Matrix*. Diciembre 2010. (Confidencial)
6. Howirtz, J. 2003. *Validation: An invisible component on measurement*. Recuperado de internet el 27 de septiembre de 2010. <http://www.aoac.org>
7. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)*. Citado en línea en: <http://www.fao.org>.
8. RDLS-RD110070 *Discussion paper on pesticide residues analysis: Status and proposed next step. Julio 2011*. (Confidencial)
9. SANCO/12571/2013 19 November 2013 rev. 0. *Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. Citado en línea en: [http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/guidance\\_documents/docs/qualcontrol\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf)
10. *Surveillance of Chemical and Microbiological Contaminants: Annual Guidance Document 2011*. (Confidencial)
11. Yurrita, Ingrid. 2006. *Validación del Método AOAC 994.15 para la determinación del perfil de ácidos grasos CIS-TRANS en aceite y grasas por cromatografía de gases*. Tesis Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala. 47 págs.

# XI. ANEXOS

Figura 8 Mezcla de estándares Phos 2, 100 ppb's

