



Desarrollo, validación y estimación de incertidumbre de un método cromatográfico para determinar residuos de plaguicidas organofosforados y cipermetrina en tomate.

Mariano Guerrero S¹, Jonathan Herrera M¹

¹ Centro para la Investigación en Recursos Acuáticos de Nicaragua (CIRA/UNAN-Managua)
Apartado Postal 4598, Managua Nicaragua. mariano.guerrero@cira.unan.edu.ni

Resumen

Nicaragua es un país agrícola que hace amplio uso de plaguicidas para proteger los cultivos; sin embargo, carece de aplicación de normas para la regulación de plaguicidas y en consecuencia los productos pueden acarrear concentraciones de agroquímicos que podrían afectar la salud del consumidor. Se desarrolló una metodología que permita determinar residuos de nueve plaguicidas fosforados y un piretroide en tomate (*Solanum lycopersicum*), además se pretende que sea de utilidad para evaluar en futuros estudios, si este producto cumple con los límites máximos de residuos establecidos en el Codex Alimentarius.

Los compuestos estudiados aplicando la técnica de cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC-ECD) son: Mocap, Diazinón, Metil-paratión, Fenclorfos, Malatión, Etil-paratión, Clorfenvinfos, DEF, Etión y Cipermetrina y empleando la guía *Analytical Chemistry in Europe* (EURACHEM) se evaluaron los siguientes parámetros de validación: límite

de detección y cuantificación para el sistema cromatográfico y el método analítico, sensibilidad, linealidad y exactitud; Además se estimó la incertidumbre del método. Los resultados obtenidos, se evaluaron por medio de criterios de aceptación, la linealidad del método determinada por regresión entre 50 ng.g⁻¹ a 120 ng.g⁻¹ y cumpliendo el criterio de aceptación $r^2 \geq 0,99$; la exactitud del método estimada por veracidad que a la vez se evalúa por sesgo y recuperación ambas con análisis del t-crítico de student y la precisión medida por repetibilidad en base al coeficientes de variación de Horwitz, ambos componentes cumplieron los criterios, demostrando que el método produce resultados exactos. El límite de detección del método se encuentra en un rango de 2,84 ng.g⁻¹ a 51,01 ng.g⁻¹ este se determinó por repetibilidad y analizadas por el t-crítico; al cumplir los criterios se demuestra que el método es eficiente para los fines desarrollados.

Palabras claves: inocuidad, plaguicidas fosforados, piretroides, validación, tomate.

Abstract

Nicaragua is an agricultural based country that makes extensive use of pesticides to protect crops; however, there is a lack of normative for the application and regulation of pesticides, as a consequence, agricultural products can lead concentrations of

chemicals that could affect the consumer's health. A methodology for the residues determination of nine organophosphorus pesticides, and pyrethroid in tomato (*Solanum lycopersicum*) was developed. The methodology developed is intended to be

useful for future studies, related to the compliance of maximum residue limits stated in the Codex Alimentarius.

The chemical compounds: Mocap, Diazinon, Methyl parathion, Fenclorphos, malathion, Parathion ethyl, Chlorfenvinphos, DEF, Ethion and Cipermetrina were analyzed using gas chromatography with the electron capture detector (GC-ECD) technique. According to the guidelines of *Analytical Chemistry in Europe* (EURACHEM), the following validation parameters were evaluated: detection and quantification limit for the chromatographic system and the analytical method, sensitivity, linearity and accuracy; besides, the method uncertainty was estimate. The results were evaluated through acceptance criteria and method linearity was determined by regression between 50 ng.g⁻¹-

120 ng.g⁻¹ and fulfilling the acceptance criteria of $r^2 \geq 0.99$; method accuracy was estimated through veracity, which in turn was evaluated for bias and recovery, both using analysis of student t-critical, the precision was measured by repeatability, based on the Horwitz variation coefficients, both components meet the criteria, demonstrating that the method produces accurate results. The detection limit of the method is found in a range of 2.84 ng.g⁻¹ to 51.01 ng.g⁻¹. This was determined by repeatability and analyzed by the t-critical. The methodology developed, meet the validation and uncertainties criteria, showing that the method is efficient for the intended purposes.

Keywords: safety, organophosphorus pesticides, pyrethroids, validation, tomato.

Introducción

En la actualidad la producción y distribución de alimentos naturales inocuos es una preocupación de interés mundial, por lo tanto se busca optimizar la protección de los cultivos para minimizar las pérdidas; en este sentido la producción de alimentos también está ligada al uso de plaguicidas debido a la vulnerabilidad de estos al ataque de las plagas. En Nicaragua, existen pocas investigaciones con enfoque a la determinación de plaguicidas fosforados y cipermetrina en tomate; sin embargo, en países como Chile, Colombia, México y Costa Rica si ha surgido la inquietud de conocer el estado de vegetales de consumo nacional en cuanto a residuos de plaguicidas y han analizado muestras de tomate en los que se han determinado metamidophos, forate, malatión, butrofezin, Oxamyl entre otros y que incluso han superado los límites máximos permisibles establecidos por el Codex Alimentarius (Gutiérrez, J.A. & Londoño, A. 2009; Ramírez, L. 2009).

Nicaragua es un alto productor de alimentos vegetales, es claro que se está haciendo constante uso de plaguicidas organofosforados y cipermetrina en distintas plantaciones como café, lechuga, repollo y principalmente en tomate. Sin embargo, por las características físico-químicas de estos compuestos, una pequeña parte llega al objetivo mientras que la mayor parte alcanza un destino diferente impactando de diversas formas al medio ambiente. Cabe mencionar, que en estudios realizados en otros compartimentos ambientales como agua superficial, agua subterránea, sedimento y suelo se han identificado estos plaguicidas (MAGFOR, 2002).

Los plaguicidas fosforados y el piretroide cipermetrina son compuestos de alta toxicidad (Tabla 1), que pueden bioacumularse en distintos organismos y provocar grandes daños como inmunodeficiencia en la fauna del suelo, transtornos reproductivos en el ser humano,

inhibe algunas vitaminas, produce cánceres y otras enfermedades que se manifiestan incluso de 5 a 10 años de estar expuestos a ellos. (Ficha técnica Ethion, 2001., Ficha técnica Cipermetrina, 2011).

En vista a todo lo mencionado anteriormente y tomando en cuenta que el tomate es uno de los cultivos con mas demanda por la población nicaragüense y a la vez añadiendo que no recibe ningún tipo de tratamiento por los consumidores para eliminar residuos de estos plaguicidas antes de ser consumidos, surge la importancia y necesidad de desarrollar una metodología eficiente que nos permita conocer la cantidad de residuos de estos plaguicidas en el tomate para ello se seleccionaron nueve plaguicidas fosforado y el piretroide cipermina sientos los mas utilizados en este tipo de cultivo. Tambien cabe señalar que el consumo de este vegetal sin una debida orientación o regulación de este tipo de contaminación puede ser el causante de muchos daños tóxicos en la salud de las personas. (Ficha del tomate, Nicaragua, 2007).

Materiales y métodos

Equipos utilizados

El desarrollo del método esta meramente ligado a pruebas experimentales, por tal razón, se utilizaron distintos tipos de equipos eléctricos, digitales y volumétricos de vidrio como: Licuadora (Waring Comercial), balanza analítica (Mettler AE 160, PE 1600), Cromatografo de gases CLARUS 500-ECD (PERKIM ELMER), rotaevaporador (BUCHI 461 RE 121), bombas de vacío (gast), campana extractora de gases, mufla (Fisher Scientific) y material volumetrico clase A.

Reactivos

Los solventes y reactivos utilizados fueron: Acetona, Diclorometano y n- Hexano grado

plaguicidas para análisis de residuos de plaguicidas; cloruro de sodio 99.5% de pureza, Sulfato de Sodio 99% de pureza (previamente calcinado en mufla durante 4 horas a 550°C) , Florisil adsorbente (fisher Chemical) calcinado a 550°C.

Estándares

En la Tabla 1 se describe los estándares utilizados (CHEM SERVICE) y sus modos de acción, con un grado de pureza entre el 98% al 99%.

Tratamiento de las Muestras

Los tomates fueron seleccionados de mercados locales en Managua y para asegurar que no tuvieran residuos de plaguicidas provenientes del campo, fueron primeramente lavados con acetona y se analizaron blancos matriz para determinar cualquier contaminación que pudiese alterar los resultados. Se procedió a realizar el análisis de la siguiente manera. Los analitos se extraen de 10 g de tomate (fortificados previamente con la mezcla trabajo de nueve analitos fosforados) licuados con 30 mL de acetona, filtrados al vacío y extractados 3 veces con 50 mL de diclorometano haciendo uso de un embudo de separación. El extracto obtenido se reconcentra a 2 mL en un rotaevaporador a 35 °C y 90 rpm, se traslada a un tubo de ensayo de 12 mL y luego de reconcentrarse con nitrógeno se afora a 2 mL de los cuales 1 mL se limpia en una columna empacada con 10 g de florisil activado, eluyéndose los analitos a través de la columna con los siguientes solventes: 70 mL Hexano, 50 mL de mezcla (70:30) de Hexano/Diclorometano, diclorometano 40 mL y 60 mL de acetona con esto se obtienen tres fracciones en las cuales se encuentran los plaguicidas organofosforados y Cipermetrina, se reconcentra y se afora a 1 mL y se inyecta en el clarus 500 (CG-ECD).

Tabla 1. Estándares de plaguicidas fosforados y cipermetrina.

Compuesto	Tipo de plaguicida	Vida media	Usos
Mocap (ethoprofos)	Organofosforado	43 días	Insecticida/Nematicida
Clorfenvinfos	Organofosforado	28 días	Insecticida/Nematicida
Diazinón	Organofosforado	2 - 4 semanas	Insecticida/Nematicida
M-paratión	Organofosforado	Bajo potencial de bioacumulación	Insecticida/Nematicida
Malatión	Organofosforado	Bajo potencial de bioacumulación	Insecticida/Nematicida
DEF	Organofosforado	Potencialmente bioacumulable	Insecticida/Nematicida
Etión	Organofosforado	1-12 meses, puede prolongarse por 49 semanas.	Insecticida/Nematicida
E-Paratión	Organofosforado	Potencialmente bioacumulable	Insecticida/Nematicida
Fenclorfos	Organofosforado	Potencialmente bioacumulable	Insecticida/Nematicida
Cipermetrina	Piretroide	15 semanas	Insecticida/Acaricida

Análisis Cromatográfico

Los componentes de las muestras son identificados y cuantificados en un Cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones y columna capilar, con las áreas proporcionadas por el cromatógrafo y la ecuación siguiente determinamos las concentraciones en muestras.

Ecuación 1

$$C_{Muestras} = \frac{A_{Muestra} * C_{Estandar} * V_{Aforo}}{A_{Estandar} * m_{Muestra} (g)} = \frac{ng}{g}$$

Las concentración de las soluciones preparadas de los analitos en estudio con los que se fortificaron las muestras son: Mocap 2

000 ng.mL⁻¹, Diazinón 1 000 ng.mL⁻¹, m-paratión 400 ng.mL⁻¹, Fenclorfos 142,72 ng.mL⁻¹, Malatión 600 ng.mL⁻¹, E-Paration 142,94 ng.mL⁻¹, Clorfenvinfos 300 ng.mL⁻¹, DEF 200 ng.mL⁻¹, Etión 200 ng.mL⁻¹, cipermetrina 500 ng.mL⁻¹.

Validación y cálculo de incertidumbre

Incertidumbre combinada del método

La Ecuación 1 relaciona los parámetros involucrados en la medición, por lo tanto aplicandole la ley de propagación de la incertidumbre formamos la ecuación de la incertidumbre combinada del método que estaría dada por:

$$u_{[Analito]} = \sqrt{(u_{Am} * c_{Am})^2 + (u_{C\ Estadar} * c_{C\ Estadar})^2 + (u_{V-Aforo} * c_{V-Aforo})^2 + (u_{A-estandar} * c_{A-estandar})^2 + (u_m * c_m)^2} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

u_{Am} =Incertidumbre en las áreas de la muestra.

$u_{C\ Estadar}$ = Incertidumbre en la concentración del estándar.

$u_{V-Aforo}$ = Incertidumbre en el volumen de aforo (balón de 2 ml).

$u_{A-estandar}$ =Incertidumbre en las áreas del estándar.

u_m = Incertidumbre en la masa de muestra pesada (incertidumbre de la balanza).

c_{Am} =Coeficiente de sensibilidad para el área de la muestra.

$c_{C\ Estadar}$ =Coeficiente de sensibilidad para la concentración del estándar.

$c_{V-Aforo}$ = Coeficiente de sensibilidad para el volumen de aforo.

$c_{A-estandar}$ = Coeficiente de sensibilidad para el área del estándar.

c_m = Coeficiente de sensibilidad para la masa de muestra pesada.

(CENAM, 2004)

Nota: Los coeficientes de sensibilidad describen que tan sensible es el mesurando con respecto a las variaciones de la magnitud y se calculan por medio de la derivada parcial en función de cada componente de la ecuación.

Incertidumbre Expandida (U)

Una vez determinada la incertidumbre combinada del método, se calculó la incertidumbre expandida la cual define un intervalo de confianza, donde se espera que se encuentre la cantidad que se está midiendo. Se obtiene multiplicando la Incertidumbre Combinada por factor de cobertura k; para un grado de confiabilidad del 95%, k=2.

$$U = u * k \quad \text{Ecuación 3} \\ \text{(CENAM, 2004)}$$

Parámetros de validación

Límite de detección (LOD) y cuantificación instrumental (LOQ)

El límite de detección instrumental es la cantidad mínima que puede ser detectada por

el instrumento utilizado. Se inyectó una curva de calibración y se calculó usando la metodología de los mínimos cuadrados según Miller N. J. & Miller, J.C. (2002) usando las siguientes ecuaciones:

$$LOD = a + \frac{3sy}{x} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$LOQ = a + \frac{10sy}{x} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde

a: Intercepto

sy: Desviación estándar con respecto a las concentraciones

Sensibilidad del método

La sensibilidad es el coeficiente entre el cambio en la indicación de un sistema de medición y el cambio correspondiente en el valor de la cantidad objeto de medición.

Se evaluó por medio del análisis de una regresión (Tabla 2) y el valor de sensibilidad es la pendiente (b) debido a que nos permite una discriminación adecuada de los valores de concentración en base a la lectura, entre más se acerque la pendiente al eje y más sensible es el método a los cambios de concentraciones del analito en estudio.

Exactitud del método

La exactitud representa la proximidad de los resultados de una medición al valor de referencia o valor aceptado. Evalúa los efectos sistemáticos y los aleatorios por medio de dos componentes los cuales son la veracidad y la precisión.

Veracidad

Proximidad de la media aritmética de una serie de resultados de pruebas a un valor de

referencia (esto en caso que se tenga un material de referencia certificado) o estadístico (t-student). Se evaluó por medio del sesgo y la recuperación.

Sesgo

Diferencia entre la expectativa relativa a los resultados de un ensayo o una medición y el valor verdadero (X_0), se calculó con la siguiente ecuación.

$$S = \bar{X} - X_0 \quad \text{Ecuación 6}$$

Luego para evaluar el sesgo se analizaron siete réplicas fortificadas a las concentraciones de la mezcla de trabajo (*ver etapa de análisis cromatográfico*); se calculó el estadístico “t” (*Ecuación 7*) de la media aritmética (\bar{X}) de las concentraciones recuperadas y se aplicó el siguiente criterio de aceptación t-crítico calculado \leq t-crítico student. El valor de referencia de “t” de las Tablas estadísticas de student a un grado de confianza del 95%, y n-2 grados de libertad “t”= 2,57.

$$t_{\text{Crítico calculado}} = \frac{(\bar{X}_{\text{Concentraciones Recuperadas}} - C_{\text{Agregada}}) * \sqrt{n}}{S} \quad \text{Ecuación 7}$$

$$C_{\text{Agregadas}} = \frac{C_{\text{Standar}} * V_{\text{aforo (mL)}}}{\text{Masa (g)}} \quad \text{Ecuación 8}$$

Miller N. J. & Miller, J.C. (2002)

Recuperación

Se utiliza en casos que no se disponga de material de referencia certificado (MRC), útil para el monitoreo de la calidad en muestras con matrices complejas con grandes interferencias

El recobro se calculó a través de la siguiente ecuación:

$$\% R = \frac{C_{\text{Recuperada}}}{C_{\text{Agregada}}} * 100 \quad \text{Ecuación 9}$$

(*Guía Técnica sobre Trazabilidad e Incertidumbre en CG y CLAR, 2004*)

La Evaluación práctica de la recuperación se realizó una curva de calibración fortificando réplicas de matriz (tomate) a cinco niveles de

concentraciones por triplicado y en un rango del 65.5 a 150 % (*los cuales serán expresados en la linealidad del método*). Se aplica también la prueba del t-crítico de student la cual se calcula con la siguiente ecuación:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{[100-\%R]}{S \cdot \sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde:

$t_{\text{calculado}}$ = t calculado del promedio de las mediciones. R= recuperación

S= desviación estándar de las lecturas del porcentaje de recobro

n= número de lecturas o valores observados

Precisión

Es la proximidad de los resultados unos con otros y se evaluó a través de la repetibilidad. (Guía Técnica sobre Trazabilidad e Incertidumbre en CG y CLAR, 2004).

La repetibilidad

Se analizaron siete réplicas fortificadas con los analitos en estudio, se calculan las concentraciones recuperadas con (Ecuación 1) y luego se determina el Coeficiente de variación (C.V.).

Para el análisis de la repetibilidad se aplica el criterio de aceptación en base al coeficiente de variación de Horwitz, que expresa que la precisión se considera aceptable cuando su coeficiente de variación experimental es inferior a la mitad del valor calculado con la ecuación de Horwitz ($C.V < C.V h\% / 2$)

Para calcular el coeficiente de variación de Horwitz se usa la siguiente ecuación:

$$CVh\% = 2^{(1-0,5)\log C} \quad \text{Ecuación 11}$$

C= concentración agregada del analito expresada en g/mL.

Límite de Detección (LDM) y Cuantificación del Método (LQM)

Para determinar el límite de detección y cuantificación del método, se utilizó la metodología señal – ruido, lo que consistió en comparar la respuesta del blanco matriz con la respuesta de los analitos en estudio en los distintos niveles de una curva de calibración. Se elige el nivel de la curva en el que los analitos se pueden distinguir de las señales ruido y el límite de detección del método se calculó multiplicando por tres la concentración seleccionada y por seis para el límite de cuantificación.

Luego con la concentración seleccionada se fortificaron siete réplicas y se analizaron se realiza la prueba de comparación de medias (estadístico del t-crítico de student) para ver si existen errores significativos en las repeticiones el valor. (Guía Técnica sobre Trazabilidad e Incertidumbre en CG y CLAR, 2004).

Linealidad del método

Habilidad del método para obtener resultados proporcionales a concentración variables¹. La evaluación práctica consistió en preparar por triplicado, muestras fortificadas a cinco niveles de concentración diferentes (62.5%, 75%,100%, 125%, 150%), la concentración del nivel central (100%) debe ser la que comúnmente se prepara la solución de trabajo para el análisis con el método, luego se preparan dos niveles superiores y dos inferiores a esta concentración (Tabla 2). El criterio de aceptación se hace en base al coeficiente de determinación $r^2 \geq 0.99$.

¹ Usar Ecuación 8 para calcular concentraciones ng/g (Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en CG y CLAR, 2004).

Tabla 2. Concentraciones de la regresión para evaluar la linealidad del método.

% Evaluado →	62.5%	75%	100%	125%	150%
Concentraciones en cada nivel (ng.g⁻¹)	[ng.g ⁻¹]	[ng.g ⁻¹]	[ng.g ⁻¹]	[ng.g ⁻¹]	[ng.g ⁻¹]
Mocap	50.00	60.00	80.00	100.00	120.00
Diazinón	25.00	30.00	40.00	50.00	60.00
M-Paratión	10.00	12.00	16.00	20.00	24.00
Fenclorfos	3.56	4.28	5.70	7.13	8.56
Malatión	15.00	18.00	24.00	30.00	36.00
E-Paratión	3.57	4.28	5.71	7.14	8.57
Clorfenvinfos	7.50	9.00	12.00	15.00	18.00
DEF	5.00	6.00	8.00	10.00	12.00
Etión	5.00	6.00	8.00	10.00	12.00
Cipermetrina	30.00	40.00	50.00	60.00	75.00

Resultados

El método desarrollado permite determinar la presencia de los nueve plaguicidas organofosforados y la cipermetrina en tomate; sin embargo también es necesario determinar las fortalezas y debilidades del método y por tal razón, se evaluaron los parámetros de validación y el cálculo de la certidumbre, obteniendo los resultados que se plantean a continuación.

Resultados de las incertidumbre asociada a las concentraciones

En la Tabla 3 se presentan los resultados de la estimación de la incertidumbre expandida del método para cada analito estudiado. Se puede observar que no existe influencia significativa de parte de las fuentes de incertidumbre en los análisis realizados.

Tabla 3. Incertidumbre estimada para las concentraciones recuperadas.

Analitos	Concentraciones en la Mezcla de Cuantificación ng.mL ⁻¹	Incertidumbre combinada mezcla de cuantificación	Concentraciones Reales (Teóricas) ng.g ⁻¹	Concentraciones reales recuperadas ng.g ⁻¹	U-Expandida 95% confianza concentración reales
Mocap	400.00	±9.17	80.00	81.98	±4.01
Clorfenvinfos	60.00	±2.17	12.00	12.62	±0.94
Diazinón	200.00	±7.10	40.00	43.73	±3.19
m-Paratión	80.00	±5.38	16.00	15.37	±2.08
Fenclorfos	28.54	±0.68	5.70	4.92	±0.24
Malatión	120.00	±4.23	24.00	25.40	±1.84
E-Paratión	28.84	±1.37	5.76	5.80	±0.56
DEF	40.00	±1.41	8.00	7.12	±0.51
Etión	40.00	±2.70	8.00	8.07	±1.10
HCB	10.00	±0.18	2.00	1.66	±0.06
Cipermetrina	250.00	±7.15	50.00	49.66	±0.85

Resultados de límites de detección y cuantificación instrumental.

Los límite de detección y cuantificación instrumental, nos permiten establecer la

concentración mínima que puede ser detectada y cuantificada por el cromatógrafo (Clarus 500), para cada analito estudiado. Además que observamos la respuesta ante los compuestos estudiados. (Tabla 4)

Tabla 4. Límite de detección y cuantificación instrumental

No	Analitos	NIVEL1 ng.mL ⁻¹	NIVEL 2 ng.mL ⁻¹	NIVEL3 ng.mL ⁻¹	NIVEL4 ng.mL ⁻¹	NIVEL5 ng.mL ⁻¹	NIVEL6 ng.mL ⁻¹	Límite de Detección instrumental [ng.mL ⁻¹]	Límite de Cuantificación instrumental [ng.mL ⁻¹]
1	Mocap	40.00	100.00	160.00	200.00	300.00	400.00	20.01	66.72
2	Diazinón	50.00	60.00	80.00	100.00	150.00	200.00	7.68	25.66
3	M-Paratión	20.00	24.00	32.00	40.00	60.00	80.00	0.47	1.58
4	Fenclorfos	7.13	8.56	11.41	14.27	21.40	28.54	0.68	2.29
5	Malatión	30.00	36.00	48.00	60.00	90.00	120.00	1.87	6.25
6	E-Paratión	7.14	8.57	11.43	14.29	21.44	28.58	0.91	3.04
7	Clorfenvinfos	15.00	18.00	24.00	30.00	45.00	60.00	2.72	9.09
8	DEF	10.00	12.00	16.00	20.00	30.00	40.00	1.43	4.77
9	Etión	10.00	12.00	16.00	20.00	30.00	40.00	1.02	3.40
10	Cipermetrina	50.00	100.00	200.00	250.00	375.00	500.00	69.60	232.02

Resultados para el límite de detección del método

Se determinó el límite de detección del método para establecer la concentración en la

que las respuesta de los analitos de interés se diferencien del efecto matriz. En la Tabla 5 se plantean los límites con el criterio de aceptación correspondiente.

Tabla 5. Límite de detección del método.

Analito	Promedio de Concentraciones Recuperadas de las 7 réplicas ng.g ⁻¹	Desviación Estándar (S)	Coficiente de variación C. V	t-crítico Calculado	t-crítico Referencia
	LDM				
Mocap	39.32	1.77	4.52	1.00	2.57
Diazinón	20.19	1.08	5.37	0.48	
M-Paratión	8.00	0.57	7.15	0.01	
Fenclorfos	2.84	0.12	4.47	0.15	
Malatión	12.47	0.83	6.69	1.50	
E-Paratión	2.96	0.20	6.84	1.34	
Clorfenvinfos	6.06	0.51	8.48	0.33	
DEF	3.81	0.36	9.67	1.34	
Etión	3.81	0.24	6.39	1.97	
Cipermetrina	51.01	4.45	8.72	0.60	

Resultados de la exactitud (veracidad y precisión)

La exactitud estudia los errores sistemáticos por medio de la veracidad, la cual al estimar el sesgo se obtiene la diferencia entre las mediciones y un valor de referencia o valor

aceptado y los errores aleatorios por medio de la precisión, al observar la cercanía entre los resultados de distintas repeticiones. En la Tabla 6 se plantean los resultados de la exactitud y en la Tabla 7 se muestran los resultados de la veracidad por medio de la prueba de Recobro.

Tabla 6. Resultados de veracidad y precisión.

Analito	Conc. [ng/mL]	C.Real [ng/g]	Promedio de las concentraciones de 7 réplicas (\bar{x})	Desviación Estándar (S)	Precisión		Veracidad		
					%C.V	%C.Vh	Sesgo	t- Calculado	t- Crítico 95%
Mocap	400	80	81.0406	2.5353	3.1284	9.1830	1.0406	1.0859	2.57
HCB	10	2	1.8270	0.26651	6.4319	16	-0.1729	1.7166	
Diazinón	200	40	40.7833	2.0266	4.9692	10.1928	0.7833	1.0225	
M-Paratión	80	16	15.4317	0.6464	4.0352	11.7001	-0.5682	2.3259	
Fenclorfos	28.544	5.7088	5.44843	0.3124	5.0725	13.6634	-0.2603	2.2044	
Malatión	120	24	24.4960	1.2607	5.1466	11.0075	0.4960	1.0410	
E-Paratión	28.588	5.7176	6.0208	0.3452	4.7891	13.6602	0.3032	2.3234	
Clorfenvinfos	60	12	12.4937	0.5993	4.1105	12.2179	0.4937	2.1798	
DEF	40	8	7.8861	0.3586	4.5479	12.9868	-0.1138	0.8399	
Etión	40	8	8.3043	0.4134	4.9785	12.9868	0.3043	1.9475	
Cipermetrina	250	50	51.0644	1.7845	3.4946	9.8562	1.0644	2.1082	

Tabla 7. Resultados de la veracidad por medio de la prueba de Recobro.

Analito	Promedio de los porcentajes de recobro %	Desviación estándar (S)	t- crítico de los porcentajes de recobro	t-crítico de referencia
Mocap	101.14	2.66	0.19	3.18
Diazinón	97.02	2.15	0.61	
M-Paratión	98.35	2.68	0.27	
Fenclorfos	96.89	4.24	0.32	
Malatión	99.38	2.58	0.10	
E-Paratión	95.07	4.80	0.45	
Clorfenvinfos	99.47	8.90	0.02	
DEF	106.03	2.59	1.03	
Etión	100.91	3.96	0.10	
Cipermetrina	103.66	2.31	0.70	

Resultados de la Linealidad y Sensibilidad del método

La linealidad establece un rango en el que el método produce resultados lineales y la

sensibilidad evalúa la respuesta del método ante las distintas concentraciones; en la Tabla 8 y se presentan los resultados y criterios de aceptación para las pruebas realizadas.

Tabla 8. Resultado de la regresión para el Mocap.

Analito	Concentración real (ng.g ⁻¹)		Promedio de las Concentración recuperadas (ng.g ⁻¹)	Pendiente (b)	Intercepto (a)	Coeficiente de Determinación (r ²)
Mocap	62.50%	50	52.17	0.98	1.63	0.99
	75%	60	58.52			
	100%	80	82.17			
	125%	100	101.52			
	150%	120	119.46			
	I.C de la b		±0.10			
	C.V ($\frac{y}{x}$)		2.30			

Linealidad del Mocap

Concentración Recuperada (ng/g)

Concentración Real agregada (ng/g)

$y = 0.9895x + 1.6319$
 $R^2 = 0.9966$

Tabla 9. Valores de pendiente y coeficiente de determinación para los demás analitos.

Analitos	Valor de Sensibilidad del método		Criterio de aceptación para la Linealidad del método	
	Pendiente (b)	Intersecto (a)	Coeficiente de determinación (r ²)	Coeficiente de determinación de referencia
Mocap	0.9895	1.6319	0.9966	0.99
Diazinón	0.9528	0.6133	0.9963	
m-paratión	1.0596	-1.1361	0.9988	
Malatión	1.0311	-0.8332	0.9968	
Fenclorfos	1.0168	-0.2510	0.9885	
E- Paratión	0.8195	0.6966	0.9965	
Clorfenvinfos	1.2064	-2.3343	0.9949	
DEF	1.1171	-0.4329	0.9958	
Etión	1.0975	-0.6598	0.9968	
Cipermetrina	1.0024	1.5421	0.9980	

Discusión

La metodología desarrollada es apta y eficiente para determinar residuos de nueve plaguicidas fosforados y el piretroide cipermetrina en tomate, esto se comprobó por medio de la validación en lo cual observamos que se cumplen los criterios de aceptación para cada uno de los parámetros evaluados y la estimación de la incertidumbre, la cual permitió estimar la dispersión que causaron las fuentes de incertidumbre en el transcurso del análisis.

Los límites de detección y cuantificación instrumental (Tabla 4) nos permitieron establecer la concentración mínima que puede ser detectada y cuantificada, además se comprobó que produce resultados lineales y es sensible para determinar estos tipos de plaguicidas, debido a que el cambio de respuesta fue proporcional a los cambios de concentración.

El límite de detección del método (Tabla 5) determinado por la metodología señal-ruido para el cual se fortificaron siete réplicas, cumplió con el criterio de aceptación del t-crítico de student para un nivel de confianza del 95% y n-2 grados de libertad, lo que nos da certeza que las respuestas obtenidas con ésta metodología se debieron a la identificación inequívoca de los analitos en estudio y se diferenciaron del ruido matriz.

La exactitud (Tabla 6) se evaluó en dos componentes que son veracidad y precisión a través de los resultados pudimos conocer la influencia de los errores sistemáticos y aleatorios en las mediciones.

La veracidad que a la vez se evaluó por sesgo nos brinda información de los errores sistemáticos provenientes de los instrumentos de medición utilizados o mala manipulación en el momento del análisis. El sesgo determinó la diferencia que existe entre el valor obtenido del análisis y el valor real de la medición, al cumplir el criterio de

aceptación del t- crítico de student, se demuestra que no existe diferencia significativa con respecto al valor verdadero, por lo tanto, el método desarrollado permite conocer los residuos de plaguicidas en muestras de tomate y a la vez tener la certeza que los errores sistemáticos no afectan significativamente el resultado.

La precisión evaluada por repetibilidad en la que se utilizaron siete réplicas fortificadas, evaluó la capacidad del método de producir resultados parecidos entre ellos y repetibles con variaciones mínimas, lo cual se comprobó al cumplir con el criterio en base al coeficiente de variación de Horwitz, estos resultados nos indica que los errores aleatorios no influyen significativamente en el análisis.

La linealidad y sensibilidad del método cumplieron con el criterio de aceptación al obtener un $r^2 \geq 0,99$, estos resultados muestran que el método desarrollado es sensible y eficiente para determinar concentraciones bajas y altas en muestras de tomate dentro del rango determinado para cada analito (Tabla 2).

Por medio de la estimación de la incertidumbre identificamos las variaciones causadas en cada una de las etapas de medición provenientes de las condiciones ambientales de trabajo, errores de equipos electrónicos y asignamos un rango con el 95% de confiabilidad que dentro del cual se encuentre el valor verdadero de nuestra medición.

Conclusiones.

El método analítico desarrollado permite la determinación de residuos de nueve plaguicidas organofosforados y cipermetrina en tomate usando un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de captura de electrones (CG-ECD).

El método analítico para la estimación cuantitativa de Plaguicidas Organofosforados y Cipermetrina en tomate utilizando Cromatografía de Gases satisface los criterios de aceptación establecidos en la norma EURACHEM para los parámetros de validación evaluados, esto nos permite concluir que el método presenta un buen desempeño en el análisis de plaguicidas fosforados y la cipermetrina en tomate.

El cromatógrafo utilizado produjo resultados lineales, al ser evaluado su desempeño con curvas de calibración en el rango de concentraciones entre 40 ng.mL^{-1} a 400 ng.mL^{-1} base al Mocap, para los nueve plaguicidas organofosforados y en el rango de 50 ng.mL^{-1} a 500 ng.mL^{-1} en el caso de la cipermetrina.

En cuanto a los resultados del límites de detección y cuantificación concluimos que nos permiten la identificación y cuantificación inequívoca de los analitos de interés, los resultados para el límite de detección instrumental se encuentra en un rango de los $0,4747 \text{ ng.mL}^{-1}$ a $69,6074 \text{ ng.mL}^{-1}$ y el límite de cuantificación instrumental entre los $1,5824 \text{ ng.mL}^{-1}$ a 232 ng.mL^{-1} , por otro lado, el límite de detección del método está entre $2,8470 \text{ ng.g}^{-1}$ y $51,0112 \text{ ng.g}^{-1}$.

El método desarrollado es lineal y sensible ya que presenta buena respuesta a la recuperación de las distintas concentraciones de los analitos en estudio, este cumple con los criterios de aceptación establecidos por la guía EURACHEM pues los coeficientes de determinación fueron mayores a 0.99.

El método es exacto ya que cumplió con los criterios de aceptación, en cuanto al cálculo de la veracidad, la prueba del sesgo y la prueba de recuperación. En ambos casos se obtuvo que el t-crítico es menor al t-crítico de referencia, lo que demostró que los valores obtenidos están cercanos al valor real.

La precisión también cumplió con el criterio de aceptación de Horwitz, ya que la incertidumbre asociada a las concentraciones recuperadas de cada analito por el método, nos muestra que no hubo dispersión significativa en la medición por parte de las fuentes de incertidumbre en el análisis de los mismos.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento al Centro para la Investigación en Recursos Acuáticos (CIRA/UNAN) de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-Managua), por brindarnos apoyo en la realización de este trabajo monográfico en el laboratorio de Contaminantes Orgánicos.

A nuestro tutor MSc. Jorge Cuadra Leal y asesor Lic. Josseth Martin Díaz por brindarnos apoyo con sus experiencias y conocimientos muy necesarios para el desarrollo de este trabajo.

A maestros y personal de laboratorio de Contaminantes Orgánicos del CIRA-UNAN, por brindarnos de su tiempo, apoyo, conocimientos y excelentes valores transmitidos en el desarrollo de nuestra formación profesional.

Referencias

- Araoud, M., Douki, W., Rhim, A., Najjar, M. F., & Gazzah, N. (2007). Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 42(2), 179-187.
- Corpeño, B. (2004). Manual del cultivo de tomate. Centro de inversión, desarrollo y exportación de agronegocios.

- Solano, J. C. (2004). Prácticas recomendadas para determinar y reportar la incertidumbre de las mediciones en química analítica-1. Editorial Universidad de Costa Rica.
- EURACHEM/CITAC CG4. et. al. (2000). Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Second edition.
- Garrido-Frenich, A.; Plaza-Bolaños, P.; Martínez-Vidal, J. L. 2007. "Multiresidue analysis of pesticides in animal liver by gas chromatography using triple quadrupole tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. 1153.
http://www.dolzhnos.com.ar/htm/densidad_del_aire.htm
- PNUD/MARENA (2006). Antecedentes de los plaguicidas en Inventario nacional de plaguicidas cop en Nicaragua, proyecto habilitante COP.
- Julio C Gaviola. 2011. Manual de producción de semillas Hortícolas. Clasificación botánica del tomate capítulo 2. Cosme Argerich. Pág. 1 a 12.
- Ministerio agropecuario y forestal MAGFOR. 2002. Dirección del registro nacional y control de insumos agropecuarios. Situación actual en el uso de plaguicidas e importaciones autorizadas. Nicaragua.
- Miller, N.J & Miller, J.C., (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Pearson Education, S.A.
- Proc-co-25. 2012. procedimiento operativo para la calibración y cálculo de la incertidumbre del material volumétrico, laboratorio de contaminantes orgánicos CIRA/UNAN.
- Trujillo, S., & Arias, R. (2002). Incertidumbre en la calibración de un matraz volumétrico. Centro Nacional de Metrología, CENAM, México. <http://www.cenam.mx>
- Gutiérrez, J. A., & Londoño, A. (2009). Determinación de plaguicidas organoclorados y organofosforados en tomates de mercados de cadena en las ciudades de Pereira y Armenia, Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*.
- Ramírez, L. G. (2009). Determinación de pesticidas en vegetales mediante cromatografía de gases-espectrometría de masa/masa (GC-MS/MS). Universidad Tecnológica de la Mixteca, Instituto de Agroindustrias, Laboratorios de Ciencias Químico-Biológicas, Huajuapán de León, Oaxaca, México.
- Ministerio de Fomento, Industria y Comercio Managua, Nicaragua. (2007). Ficha del Tomate. www.mific.gob.ni.
- Centro Nacional de Meteorología, (CENAM) México, Mayo 2004. Guía Técnica sobre Trazabilidad e Incertidumbre de Mediciones Analíticas que emplean las técnicas de Cromatografía de Gases (CG) y Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Centro Nacional de Metrología,
(CENAM). México. Noviembre.
2005. Eurachem-Guia-
Validacion-CNM-MRD-030-2da-
ed.

Agency for Toxic Substances and
Disease Registry (ATSDR),
Febrero 2001. Ficha técnica

ETHION división de toxicología
y medicina oriental ToxFAQs.

Agency for Toxic Substances and
Disease Registry (ATSDR),
Febrero 2011. Ficha técnica
CIPERMETRINA división de
toxicología y medicina oriental
ToxFAQs.