Rev. Colomb. Quím., 2012, 41(3): 377-394

Comparación de dos aproximaciones para la estimación de la incertidumbre en análisis de residuos de plaguicidas mediante cromatografía de gases

Comparison of two approaches to estimate the uncertainty for pesticide residue analysis by gas cromatography

Comparação de dois métodos para a estimativa da incerteza análise de resíduos por cromatografia gasosa

Diego A. Ahumada[1], Llarys W. Aparicio[2], Jean C. Fuentes[2], Jairo A. Guerrero[3], Brenda I. Checa [2,4]

Recibido: 06/08/12 – Aceptado: 27/11/12

RESUMEN

La correcta interpretación de un resultado de medición requiere el conocimiento de la incertidumbre de la medida; de esta manera, se han desarrollado diferentes aproximaciones y guías para realizar el cálculo y la interpretación de la incertidumbre de la medición. En este estudio se comparan dos aproximaciones para la estimación de la incertidumbre de una metodología, de manera rápida y económica basada en el método QuEChERS para el análisis de 15 plaguicidas organofosforados mediante cromatografía de gases con detector de nitrógeno fósforo. El primer método empleado se basa en la aproximación descrita por la guía para la expresión de la incertidumbre de medición (GUM), la cual se apoya en la combinación de las incertidumbres involucradas en los procesos de medición de la metodología. El segundo método utilizado correspondió a la aproximación propuesta por Haslôva y Stêpán, la cual incluye algunos elementos del método de arriba hacia abajo (*top down*) y se basa en el empleo de los datos de repetibilidad en diferentes etapas del proceso analítico. Los resultados mostraron que al emplear la aproximación de la GUM, los valores de incertidumbre son más bajos que al utilizar el método de Haslôva. Asimismo, mediante la aproximación GUM se encontró que el aporte a la incertidumbre por la preparación de los estándares (peso, dilución y pureza) representa el principal componente. Por otro lado, mediante el método combinado se pudo establecer que la principal fuente

1 Subdirección de Metrología Química y Biomedicina. Instituto Nacional de Metrología de Colombia. Carrera 50 26-55. Int. 2. Centro Administrativo Nacional, Bogotá, Colombia.

2 Laboratorio de control de análisis de residuos de plaguicidas en plantas y productos vegetales. Dirección Nacional de Sanidad Vegetal. Ministerio de Desarrollo Agropecuario. Panamá.

3 Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D.C., Colombia.

4 Autor de correspondencia: bcheca@mida.gob.pa

de incertidumbre corresponde al proceso de extracción de los analitos, y, en contraste, se halló que la fuente que menor aporta corresponde a la preparación de los estándares. Finalmente, los valores calculados de incertidumbre expandida mediante el método combinado se encontraron entre el 12,7 y el 27,1% de la concentración a la cual se estimó la incertidumbre.

Palabras clave: plaguicidas, QuEChERS, incertidumbre, cromatografía de gases.

ABSTRACT

The correct interpretation of a measurement result requires knowledge about its uncertainty. Very different approaches for the estimation of the uncertainty related to measurement results are found in the literature and in published guidelines. In this work two different approaches for uncertainty estimation are compared on an easy, rapid and low-cost sample preparation approach for the determination of pesticide residues in fruits by gas chromatography with nitrogenous phosphorous detector. It was determined the contributions to the uncertainty at each analytical step such as extraction, clean up, evaporation and instrumental analysis. The first method was based on the guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM) approach, which derives the uncertainty of a measurement result by combining the uncertainties related to the uncertainty sources of the measurement process. The second method was an approach previously presented by Haslôva and Stêpán, which included some elements of "top-down" estimation in that it included repeatability data generated by fortification experiments at different stages of the method to estimate the contribution of each step to the overall uncertainty. The results showed that when is employing GUM approach the uncertainty values were lowest compared with Haslôva method. Using the GUM approach uncertainty of standard preparation (uncertainties of weighing and diluting standards, uncertainties of purity of standards) was shown to represent the main source of combined standard. On the other hand, when the second method was used, the main source of uncertainty extraction process was identified. By contrast, it was found that the source contributes less to global uncertainty was the standards preparation. Finally, the expanded uncertainties for Haslôva method using a coverage factor of two were between 12.7% and 27.1% of the concentration, which was estimated uncertainty.

Key words: pesticides, QuEChERS, uncertainty, gaschromatography.

RESUMO

A correta interpretação do resultado de uma medição requer o conhecimento da incerteza de medição, assim, diferentes abordagens têm sido desenvolvidos e orientações para o cálculo e interpretação da incerteza de medição. Este estudo compara duas abordagens para estimar a incerteza de uma metodologia, mais rápido, baseado no custo método para analisar QuEChERS 15 pesticidas organofosforados por cromatografia gasosa com detector de nitrogênio e fósforo. O primeiro método utilizado baseia-se o procedimento descrito pelo guia para a expressão da incerteza de medição

(GUM) que é baseado numa combinação de incertezas envolvidas no processo de medição da metodologia. O segundo método utilizado foi o método proposto pelo Haslôva e Stepan, que inclui alguns elementos de cima para baixo método (de cima para baixo) e baseia-se na utilização de dados de repetibilidade em diferentes fases do processo analítico. Os resultados mostraram que, utilizando a aproximação dos valores de incerteza GUM são inferiores quando se utiliza o método Haslôva. Além disso, através da abordagem de goma foi encontrada para contribuir para a incerteza para a preparação de padrões (diluição de peso e pureza) é o componente principal. Por outro lado, pelo método combinado verificou-se que a principal fonte de incerteza corresponde à extracção de analitos em contraste verificou-se que a fonte fornece corresponde menos para a preparação de padrões. Finalmente, os valores calculados para a incerteza expandida foram entre 12,7% e 27,1% da concentração à qual a incerteza estimada.

Palavras-chave: QuEChERS, pesticidas, incerteza, cromatografia gasosa.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la creciente importancia que ha tomado la seguridad alimentaria, sumado a la apertura del comercio mundial, exigen que los laboratorios de control de contaminantes estén en la capacidad de generar resultados de alta confiabilidad (1, 2); por esta razón, diferentes organizaciones buscan armonizar la interpretación de los resultados analíticos generados, con el fin de facilitar el comercio y garantizar la seguridad del consumidor (3). De esta manera, para asegurar una evaluación adecuada del cumplimiento de la reglamentación respecto a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos, ya sea de consumo nacional o con fines de exportación, nace la necesidad de realizar una estimación apropiada de la incertidumbre de medición, pues este parámetro implica conocer la calidad de los resultados generados (4) y además es una exigencia para la acreditación de los laboratorios (5).

La estimación de la incertidumbre de medición es un tema de la química analítica que ha generado bastante interés y discusión en el ámbito científico, principalmente por la complejidad de su definición y por las múltiples recomendaciones que se encuentran para su cálculo e interpretación (6-8). La guía de la expresión de la incertidumbre (GUM, por sus siglas en inglés) publicada por la Organización Internacional para la Estandarización (ISO, por sus siglas en inglés) (9), establece las reglas generales para la evaluación y expresión de la incertidumbre. Esta guía ha sido interpretada por Eurachem como un enfoque aplicado a la química analítica, por lo cual se ha convertido en un documento de referencia para la mayoría de los laboratorios (10). Tanto en Eurachem como en la guía ISO, se ha establecido que para realizar una adecuada estimación de la incertidumbre es necesario: i) identificar todas las posibles fuentes de incertidumbre asociadas al proceso analítico, ii) estimar la magnitud de cada una de estas fuentes, iii) combinar estas incertidumbres y iv) expresar la incertidumbre expandida.

Asimismo, la guía Eurachem ha establecido dos estrategias principales para

la estimación de la incertidumbre: *botton up* y *top down*. El primer método tiene como ventaja que identifica todas las etapas del proceso, y por tanto ayuda en la mejora de la metodología una vez se establece su cálculo; sin embargo, presenta como desventaja que implica cálculos tediosos y subestima los errores aleatorios y sistemáticos de los métodos de extracción. Por su parte, *top down* es un método que se caracteriza por la sencillez de sus cálculos pero tiene varias desventajas, entre ellas que no identifica etapas críticas del método analítico; para su cálculo es necesario contar con ensayos de aptitud o interlaboratorios, y esto crea una dependencia con los resultados de incertidumbre estimada en otros laboratorios (4, 11).

En los últimos años se han creado métodos que combinan las dos aproximaciones, de tal modo que se puedan realizar cálculos sencillos que permitan cuantificar las principales fuentes de incertidumbre y, con ello, mejorar las metodologías de análisis (12, 13). Sumado a estos propósitos, mediante estos métodos se pretende incluir las variaciones que se puedan generar en el proceso analítico, por lo cual es común encontrar diferentes propuestas en las que se incluyen los resultados de validación del método (14, 15). Uno de los métodos más relevantes de este tipo de aproximaciones corresponde al propuesto por Štěpán en el 2004, en el cual se tienen elementos tipo *top down* y *botton up* que permiten caracterizar y mejorar las metodologías analíticas a partir de la información suministrada (16).

En este contexto, en el presente trabajo se tiene como objetivo realizar una comparación entre el método *bottom up* (BU) y un método combinado (16) propuesto por Štěpán (17) para la estimación de la incertidumbre en la determinación de 15 plaguicidas organofosforados, analizados mediante el método QuEChERS, modificado con acetato de etilo y cromatografía de gases con detector de nitrógeno fósforo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales de referencia, reactivos y soluciones

Se trabajó con estándares de plaguicidas de pureza mayor al 95%, provenientes de las casas comerciales Dr. Ehrenstorfer y Chemservice. Las soluciones madre fueron preparadas en concentraciones cercanas a 1000 μgmL^{-1} en acetato de etilo y almacenadas en frascos ámbar a -20 ºC. La mezcla de plaguicidas se preparó tomando diferentes volúmenes de cada una de las soluciones madre hasta obtener una concentración de 10 μgmL^{-1} de cada uno de los compuestos. Esta solución se almacenó en frasco ámbar a -20 ºC. Los solventes empleados en este estudio fueron J.T. Baker, MTEDIA grado HPLC y grado residuos. En los ensayos de extracción se utilizaron sales de Sigma-Aldrich y BDH Prolabo. Para la limpieza de los extractos se empleó amina primaria secundaria (PSA) VARIAN. Se usó como estándar subrogado trifenilfosfato (TPP) y como estándar interno (EI) tributilfosfato (TBP).

Instrumentos y equipos

En el proceso de extracción se empleó un homogeneizador Cuisinart DFP-7BC, un homogeneizador de alta velocidad

Ultraturrax (IKA T25) y concentrador Thermolyne Dri-Bath. Para el proceso de separación de fases se utilizaron dos centrífugas, Sigma 4K-15 y JOUAN B4i Multifunction.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases HP6890N con inyector automático 7683 Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EUA) con control electrónico de presión, equipado con inyector split/splitless conectado a una columna capilar HP-5 (30 m, 0,32 mm d.i, 0,25 μm) acoplada a un detector de nitrógeno-fósforo (NPD).

Las condiciones cromatográficas empleadas en el análisis de los plaguicidas fueron las siguientes: volumen de inyección 2 μL; inyección en modo splitless pulsado con presión de pulso de 275,8 kPa durante 0,3 min; tiempo de purga de 2,00 min, flujo de purga 40 $mLmin^{-1}$ y temperatura de inyector de 267 ºC. El gas portador fue helio. El programa de temperatura del horno fue de 85 ºC (0 min); consecutivamente se incrementó la temperatura hasta llegar a 140 ºC, a una velocidad de 4 ºC min^{-1}, y por último se obtuvo una temperatura de 280 ºC a una velocidad de 5 ºC min^{-1} por 4 min. El tiempo total del análisis fue de 45,75 min.

Finalmente, la temperatura del detector NPD fue 300 ºC con flujos de gas auxiliar de 20 $mLmin^{-1}$, de hidrógeno de 3 $mLmin^{-1}$ y aire de 60 $mLmin^{-1}$.

Método de extracción

En los estudios realizados se utilizaron muestras de tomate (*Solanum lycopersicum*), certificadas como productos orgánicos, obtenidas en supermercados de cadena. Se lavaron con abundante agua, y se retiró todo material ajeno a la fruta que pudiera encontrarse en su superficie. Posteriormente, con el fin de asegurar que las muestras se encontraran libres de plaguicidas, se analizaron mediante cromatografía de gases.

En la obtención de los extractos se empleó una metodología estandarizada y validada en ensayos previos. Para realizar este proceso, en una probeta de extracción se tomaron 30 g de la matriz homogeneizada, se le adicionaron 60 mL de acetato de etilo, 5 g de bicarbonato de sodio y 30 g de sulfato de sodio anhidro; se sometieron a extracción en un homogeneizador de alta velocidad a 11.000 rpm durante 2 min. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 7 min, y con ayuda de una pipeta mecánica se tomaron 10 mL del sobrenadante (extracto A), los cuales se transfirieron a un tubo de centrífuga de 50 mL.

Para el proceso de limpieza, por cada mililitro de extracto (extracto A) se adicionaron 25 mg de PSA (amina primaria/secundaria) y 150 mg de $MgSO_4$ anhidro, se agitó con ayuda de un vórtex por 45 s y se centrifugó por 2 min a 1900 rpm. Con ayuda de una pipeta mecánica se transfirieron 5 mL del sobrenadante (extracto B) a un tubo de vidrio graduado y se llevó al concentrador a una temperatura de 35 ºC, donde se redujo su volumen hasta aproximadamente 0,5 mL. Finalmente, se realizó una transferencia cuantitativa a un balón de 1 mL y se aforó con acetato de etilo (extracto C).

Determinación de la incertidumbre: método combinado

El método analítico se dividió en diferentes etapas. La Figura 1 muestra un diagrama del método, en el que se especifican cada una de las etapas que se tuvieron en cuenta en este estudio. Para determinar la incertidumbre asociada de cada etapa se fortificó con la mezcla de plaguicidas antes de cada proceso, como se indica a continuación. En cada uno de los ensayos se realizaron cuatro réplicas, a una concentración equivalente al nivel más alto de la curva de calibración (0,500 μgmL^{-1}).

Experimento 1 ($u_{extracción}$): se fortificaron 30 g de la muestra homogeneizada con 600 μL de la mezcla de plaguicidas de 10 μgmL^{-1}. Se realizó el proceso de extracción que se describió en la sección anterior.

Experimento 2 ($u_{limpieza}$): en un balón de 50 mL se adicionaron 500 μL de la mezcla de plaguicidas de 10 μgmL^{-1}; se aforaron con el extracto A (libre de plaguicidas); posteriormente se tomaron alícuotas de 10 mL a las cuales se les realizaron los procesos de limpieza, concentración y análisis cromatográfico.

Experimento 3 ($u_{evaporación}$)*:* en un balón de 25 mL se adicionaron 250 μL de la mezcla de plaguicidas de 10 μgmL^{-1}; se aforaron con el extracto B; por último se tomaron alícuotas de 5 mL, a las cuales se les realizaron los procesos de concentración y análisis cromatográfico.

Experimento 4 (u_{CG})*:* en 4 balones aforados de 1 mL se adicionaron 50 μL de la mezcla de plaguicidas a la misma concentración en cada uno y se aforaron con el extracto C, para luego ser analizados por cromatografía de gases.

Determinación de la incertidumbre: método *botton up*

Para la determinación de la incertidumbre mediante este método, se tuvieron en cuenta las recomendaciones de la guía Eurachem/Citac; es decir, se identificaron las principales fuentes de incertidumbre, se calculó el aporte de cada una de estas fuentes, se estimó la incertidumbre estándar para cada una de las fuentes, se combinaron y finalmente se calculó la incertidumbre expandida. En este estudio se tuvieron en cuenta las siguientes fuentes:

Extracción de los analitos ($u_{extracción}$)*:* peso de 30,00 g $\pm$ 0,01g de la muestra y adición de 60 mL $\pm$ 0,05 mL de solvente.

Limpieza de la muestra(u_{limpieza}): toma de una alícuota de 10,00 mL$\pm$0,02 mL del extracto.

Concentración o evaporación de la muestra (u_{evap}): toma de 5,00 mL $\pm$0,02 mL de la muestra y afore a un volumen final de 1,00 mL $\pm$ 0,006 mL.

Preparación mezcla de calibración y dilución ($u_{preparación}$)*:* primero, preparación de la solución madre. Peso de 10 mg del estándar, afore a un volumen de 25,00 mL $\pm$ 0,03 mL. Segundo, dilución de la solución madre donde se toma una alícuota de 100,0 μL$\pm$ 0,5 μ L y se afora a 25 mL$\pm$ 0,03 mL.

Regresión($u_{regresión}$): para la curva de calibración se prepararon 5 niveles de concentración, los cuales co-

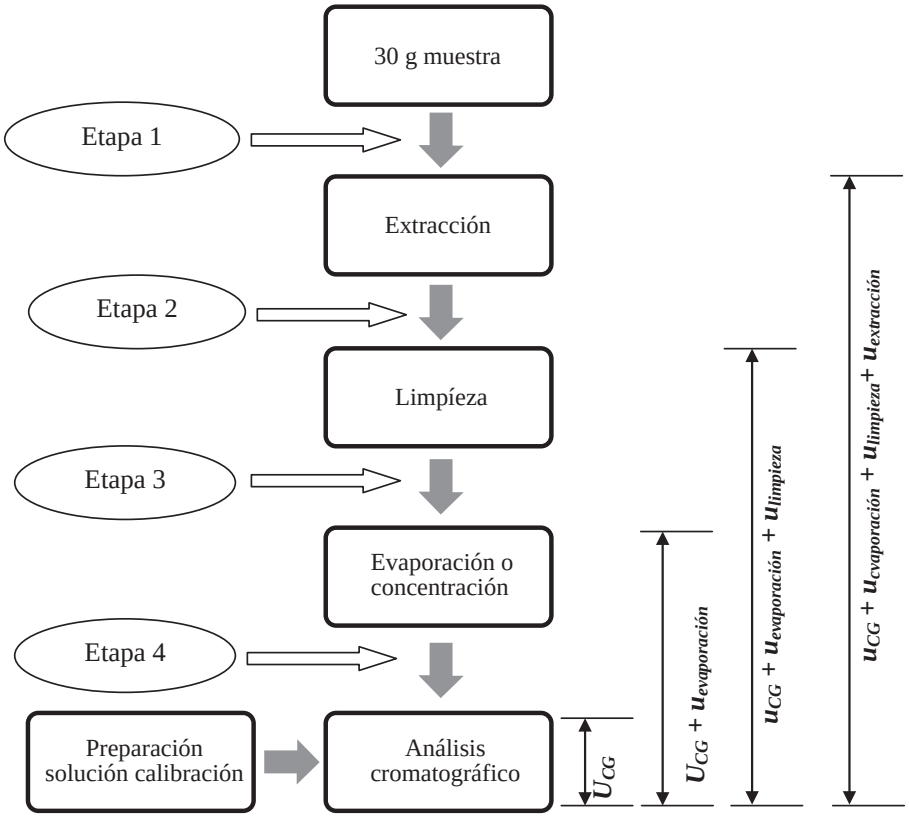

Figura 1. Componentes de incertidumbre asociados al método analítico. (Basado en R.Stepan *et al*.[17].

rrespondieron a 0,0125 μgmL^{-1}, 0,100 μgmL^{-1}, 0,250 μgmL^{-1}, 0,350 μgmL^{-1} y 0,500 μgmL^{-1}. El aporte a la incertidumbre proveniente de la regresión lineal empleada se determina mediante la expresión [1].

$$u_{regresión} = \frac{S_{x/y}}{m} x \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{q} + \frac{(X_0 - X_{promedio})^2}{\sum (X_i - X_{promedio})^2}} \quad [1]$$

Donde $S_{y/x}$ corresponde a la desviación estándar de los residuales; m es la pendiente de la curva de calibración; p es el número de determinaciones de cada punto (p=1); q el número de puntos en la curva (q=5); X_o la concentración estimada; X_i la concentración iésima de cada nivel de la curva de calibración; X_{prom} el promedio de las concentraciones de los niveles de la curva de calibración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Botton up

La Figura 2 muestra los resultados obtenidos en la determinación de la incertidumbre expandida mediante el método *botton up* para cada uno de los compuestos a una concentración de 0,200 mgkg^{-1}.

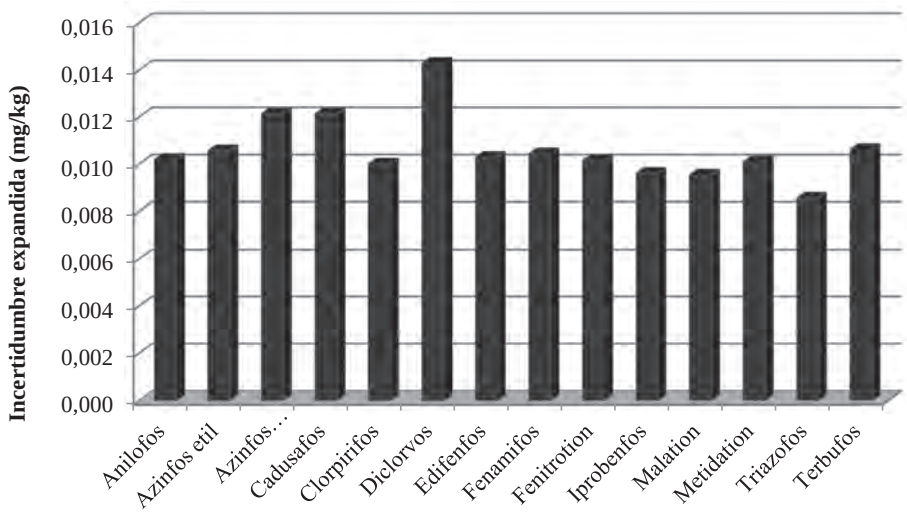

Figura 2. Incertidumbre expandida (k=2) estimada mediante el método *botton up* para una concentración de 0,200 $mgkg^{-1}$ de cada uno de los plaguicidas.

En esta figura se observa que los valores de incertidumbre para cada compuesto se encuentran en el mismo orden de magnitud y presentan valores relativamente similares; es de resaltar que estos valores son muy bajos comparados con los reportados por otros autores en este tipo de análisis (12).

La Unión Europea (3) y la guía 59-2006 del *Codex Alimentarius* (18) establecen que en el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos se permiten valores de incertidumbre expandida de hasta el 50% del valor determinado. Es decir, para una concentración de 0,200 $mgkg^{-1}$ se podrían aceptar incertidumbres expandidas de hasta 0,100 $mgkg^{-1}$; por tanto, al observar la Figura 2, se encuentra que todos los valores de incertidumbre determinados se encuentran muy debajo de este umbral, pues el valor más alto lo presenta el diclorvos y corresponde al 7% de 0,200 $mgkg^{-1}$.

La Figura 3 presenta los resultados de discriminar la incertidumbre por cada uno de sus componentes o fuentes de incertidumbre. En esta figura se encuentra que el aporte de la incertidumbre de extracción es muy bajo, lo que implica que el empleo de la balanza (peso de 30 g) y la adición del solvente de extracción (60 mL) no aportan de una manera significativa a la incertidumbre total combinada. De igual manera, la incertidumbre asociada a la limpieza de la muestra presenta valores similares, lo que refleja el aporte a la incertidumbre por la toma de la alícuota de 10 mL para el proceso de limpieza.

Esta misma figura señala que la etapa de evaporación de la muestra presenta valores de incertidumbre mayores que las etapas de extracción y limpieza, lo

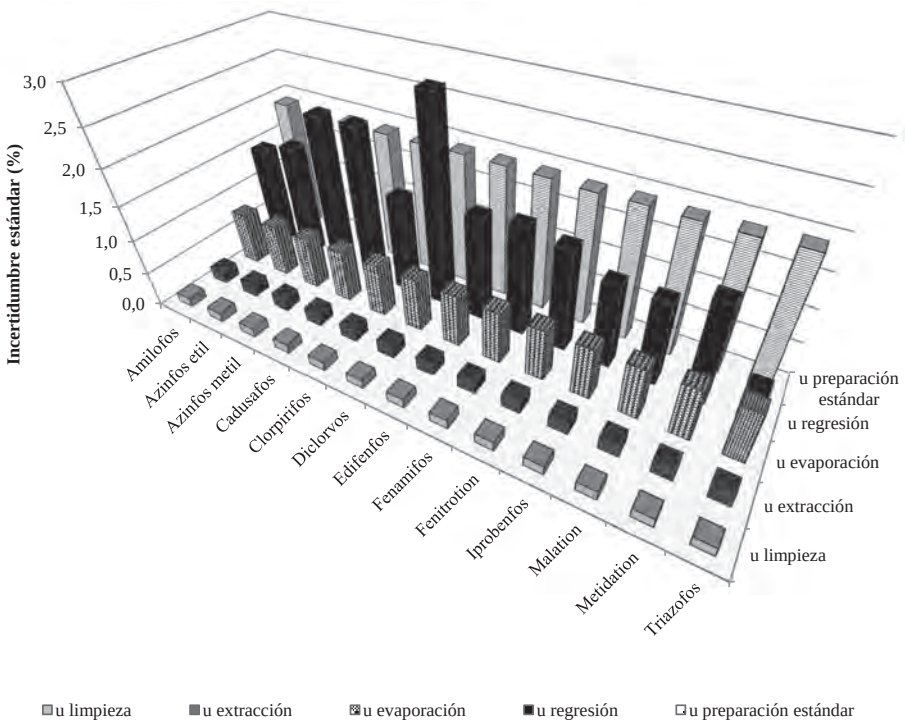

Figura 3. Incertidumbre estándar (u) discriminada por componentes. Método *botton up*.

cual se atribuye a una mayor incertidumbre debido a la toma de la alícuota de 5 mL y al empleo del balón de 1 mL. De otra parte, la $u_{preparación\ estándar}$ presenta valores casi el doble de la $u_{evaporación}$ de la muestra. Estos resultados son congruentes con las operaciones en el laboratorio, pues en la preparación de los estándares se tiene un mayor número de medidas, lo cual trae consigo una mayor propagación del error, es decir, mientras que en las etapas de evaporación, extracción y limpieza se realizaron una o dos medidas, en la preparación de estándares se tiene un mayor número de fuentes de incertidumbre: incertidumbre de la balanza, incertidumbre por pureza del estándar, incertidumbre por el balón donde se preparó la solución madre, incertidumbre en la medida del volumen de la alícuota para preparar la mezcla de plaguicidas e incertidumbre en la dilución.

Igualmente, la Figura 3 muestra que el aporte de la $u_{regresión}$ es de las dos fuentes más significativas; sin embargo, en ninguno de los casos esta incertidumbre es superior al 3%, lo cual indica que la estimación de los resultados mediante el empleo de la curva de calibración no tiene un efecto apreciable sobre el resultado final de incertidumbre. En la misma figura también se puede observar que, a diferencia de la $u_{extracción}$, $u_{limpieza}$ y $u_{preparación\ estándar}$, la $u_{regresión}$ varía de manera notoria entre cada uno de los compuestos, lo cual

se atribuye a los estimadores obtenidos en la regresión, pues cada compuesto se comporta en forma particular en el sistema cromatográfico; por ejemplo, la desviación estándar de los residuales $S_{y/x}$ depende del ajuste lineal de la respuesta cromatográfica del compuesto con la concentración, lo cual ocasiona cambios en la incertidumbre para cada compuesto.

En la Figura 3 también se observa que la $u_{extracción}$, $u_{limpieza}$,$u_{concentración}$ y $u_{preparación\ estándar}$ no presentan variación apreciable entre compuestos. Sin embargo, en la preparación del estándar la pureza no es igual para cada analito, lo que implica que cada compuesto tendrá una incertidumbre asociada diferente. En esta figura no se aprecia esta diferencia pues el aporte a la incertidumbre es muy pequeño, pero en la Figura 4 se muestra el aporte de cada componente a la incertidumbre de preparación del estándar. Se encuentra que el componente que aporta en mayor medida corresponde al peso del estándar o sea a la incertidumbre aportada por la balanza. Por su parte, el afore de la muestra es el componente que menos aporta a la incertidumbre, a pesar de que esta operación se realiza dos veces, una para la preparación del estándar y otra para la dilución. En la Figura 4 se puede observar igualmente que el aporte de la incertidumbre por pureza cambia para cada uno de los compuestos y en todos los casos es inferior a 0,3 %, razón por la cual no se aprecia en la Figura 3.

En la Figura 2 se observa una variación entre las incertidumbres estimadas para cada uno de los compuestos. Esta variación se atribuye en su gran mayoría a la incertidumbre que aporta la curva de calibración, pues como se puede observar en la Figura 3, es la única fuente que varía notoriamente entre compuestos, a excepción de la de preparación de estándares que se discutió previamente; esto hace pensar que si esta fuente de incertidumbre se omitiera, todas la incertidumbres darían aproximadamente el mismo valor, pues la única diferencia que quedaría correspondería a la incertidumbre asociada a la pureza del estándar. Este hecho no refleja la realidad de un proceso analítico en donde existen pérdidas en los procesos de extracción, concentración, limpieza y determinación cromatográfica, los cuales son directamente asociados a procesos de partición (matriz y fase extractante), hidrólisis, oxidación, adsorción o termodescomposición que puedan ocurrir durante las diferentes etapas de la metodología de análisis (19, 20). En otras palabras, mediante este método no se contemplan algunas fuentes de errores sistemáticos y aleatorios propias del proceso analítico, lo que se traduce en una subestimación de la incertidumbre global. Sumado a esto, otros autores han encontrado que el aporte por errores aleatorios y sistemáticos de los procesos analíticos corresponden a los componentes que más influyen en la magnitud de la incertidumbre global (21).

MÉTODO COMBINADO

La tendencia actual en la determinación de la incertidumbre para el análisis de contaminantes debe considerar todo el proceso analítico; por tanto es importante observar el comportamiento de los analitos tanto en la matriz de análisis como en todo el proceso involucrado (13).Štěpán desarrolló un método que permite tener en cuenta las variaciones propias de los

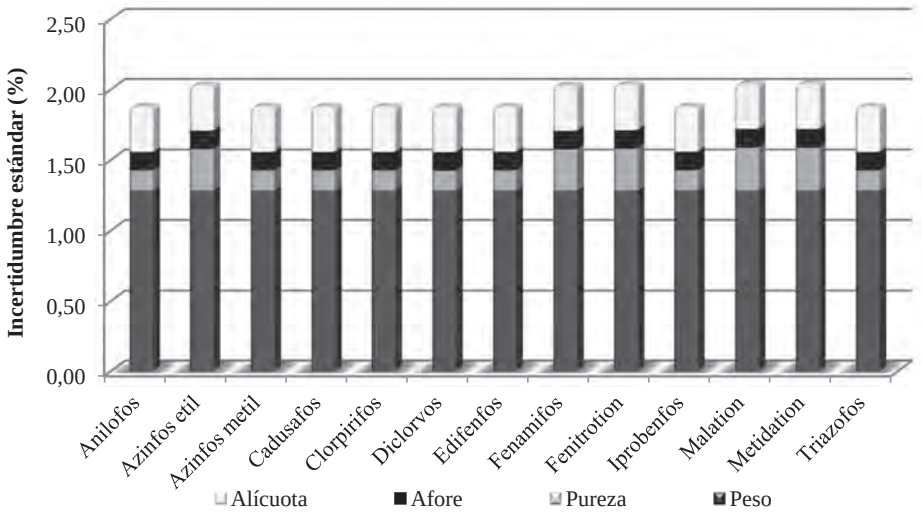

Figura 4. Aporte (%) de cada componente a la incertidumbre de preparación del estándar.

analitos y, a su vez, identificar las fuentes críticas de incertidumbre, lo cual tiene una ventaja respecto a los métodos tradicionales (17).

El método propuesto por Štěpán se basa en cuantificar los errores sistemáticos y aleatorios mediante ensayos de recuperación y repetibilidad realizados en las diferentes etapas del método analítico. Para ello, la determinación de la incertidumbre estándar de los errores aleatorios ($u(r)_{Etapa}$) se realiza mediante las ecuaciones [2] a [5].

$$u(r)_{CG} = \sqrt{\%CV^2_{Exp4}} \quad [2]$$

$$u(r)_{Evaporación} = \sqrt{\%CV^2_{Exp3} - u(r)^2_G} \quad [3]$$

$$u(r)_{Limpieza} = \sqrt{\%CV^2_{Exp2} - u(r)^2_{Evaporación} - u(r)^2_G} \quad [4]$$

$$u(r)_{Extracción} = \sqrt{\%CV^2_{Exp1} - u(r)^2_{Limpieza} - u(r)^2_{Evaporación} - u(r)^2_G} \quad [5]$$

Donde $\%CV_{Exp\ k}$ corresponde al coeficiente de variación obtenido en el *k* experimento (k=1,2,3 o 4, ver sección experimental), y $u(r)_n$ corresponde a la incertidumbre estándar en la *n* etapa.

Por su parte, para la determinación de la incertidumbre asociada a los errores sistemáticos en cada uno de los experimentos se emplea la ecuación [6].

$$u_{Experi\ k} = \frac{0.5 \times (100 - \%R_{Experimento\ k})}{\sqrt{3}} \quad [6]$$

Donde *k* representa el experimento realizado (k=1, 2, 3 o 4, ver sección experimental) y *%R* representa el porcentaje de recuperación obtenido en el *k* experimento. Posteriormente, mediante las ecuaciones [7] a [10], se determina la incertidumbre proveniente de los errores sistemáticos para cada etapa (extracción, limpieza, evaporación, análisis cromatográfico).

$$u(s)_{CG} = u_{Exp\,4} \quad [7]$$

$$u(s)_{Evaporación} = \sqrt{u(s)^2_{Exp3} - u(s)^2_G} \quad [8]$$

$$u(s)_{Limpieza} = \sqrt{u(s)^2_{Exp2} - u(s)^2_{Evaporación} - u(s)^2_G} \quad [9]$$

$$u(s)_{Extracción} = \sqrt{u(s)^2_{Exp1} - u(s)^2_{Limpieza} - u(s)^2_{Evaporación} - u(s)^2_G} \quad [10]$$

donde $u(s)_n$ corresponde a la incertidumbre estándar de los errores sistematicos para la *n* etapa.

Una vez determinada la incertidumbre asociada a componentes aleatorios y sistemáticos (u(a) y u(s)), se procede a calcular la incertidumbre estándar de cada etapa ($u_{extracción}$, $u_{limpieza}$, $u_{evaporación}$ y u_{CG}), mediante la siguiente expresión:

$$u_n = \sqrt{u(a)^2_n + u(s)^2_n} \quad [11]$$

donde u_n corresponde a la incertidumbre estándar de la *n* etapa.

Finalmente, mediante la expresión [12] se determina la incertidumbre estándar global (u_g).

$$u_g = \sqrt{u^2_{Extracción} + u^2_{Limpieza} + u^2_{Evaporación} + u^2_{Limpieza} + u^2_G + u^2_{preparación\,estándar} + u^2_{Regresión}} \quad [12]$$

Donde los primeros 4 términos de la ecuación provienen de resultados experimentales y análisis estadístico, es decir, cálculos tipo *top down*, y los siguientes dos términos provienen de los cálculos realizados por medio del método *botton up*.

En la Figura 5 aparecen los resultados obtenidos en la estimación de la incertidumbre expandida mediante el método combinado. En esta figura se puede observar que, al igual que en el método anterior, la estimación realizada es inferior a 0,100 mg/kg, correspondiente al 50% de la concentración a la cual se le estimó la incertidumbre. Por otro lado, si se comparan estos resultados con los presentados en la Figura 2, los valores estimados mediante este método resultan ser más del triple para la mayoría de los compuestos, y en algunos casos, como anilofos y edifenfos, estos valores son de más de cinco veces los obtenidos mediante el método *botton up*. De acuerdo con los reportes en literatura (21), el rango en el que se encuentran los valores de incertidumbre obtenidos resultan ser bastante acordes y se correlacionan de mejor manera que los encontrados mediante el método *botton up*.

La Figura 6 muestra los aportes de cada una de las fuentes a la incertidumbre global; en términos generales, se encuentra que al comparar las Figuras 3 y 6, el método combinado presenta un comportamiento heterogéneo de las incertidumbres, mientras que mediante el primer método (Figura 3), se observan valores similares entre las incertidumbres de los compuestos, y en algunos casos iguales, como por ejemplo la $u_{extracción}$, $u_{limpieza}$ y $u_{evaporación}$. De otra parte, en la Figura 3 se puede clasificar cada fuente en un orden descendente de aporte, mientras que la heterogeneidad que se observa en la Figura 6 impide esta clasificación a simple vista, pues el aporte de incertidumbre de cada etapa del proceso es diferente para cada compuesto. Sin embargo, de mane-

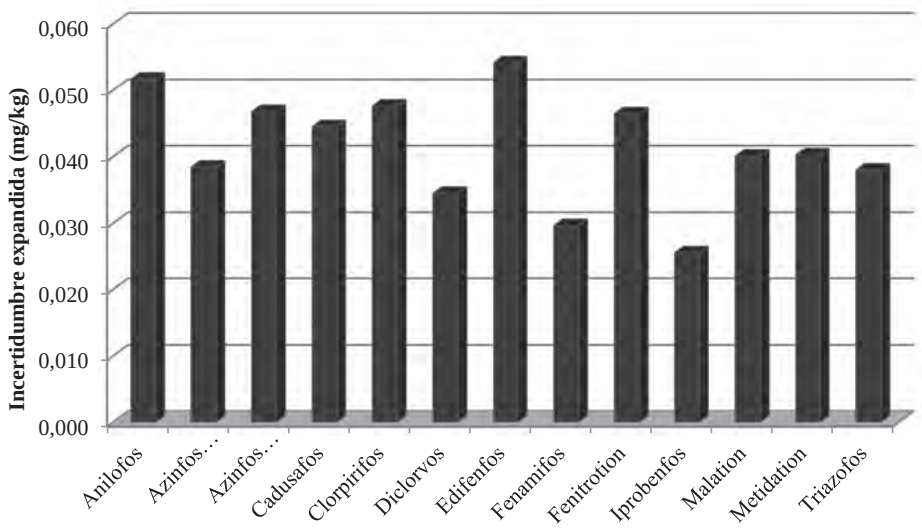

Figura 5. Incertidumbre expandida (k=2) estimada mediante el método combinado para una concentración de 0,200 mgkg^{-1} de cada uno de los compuestos.

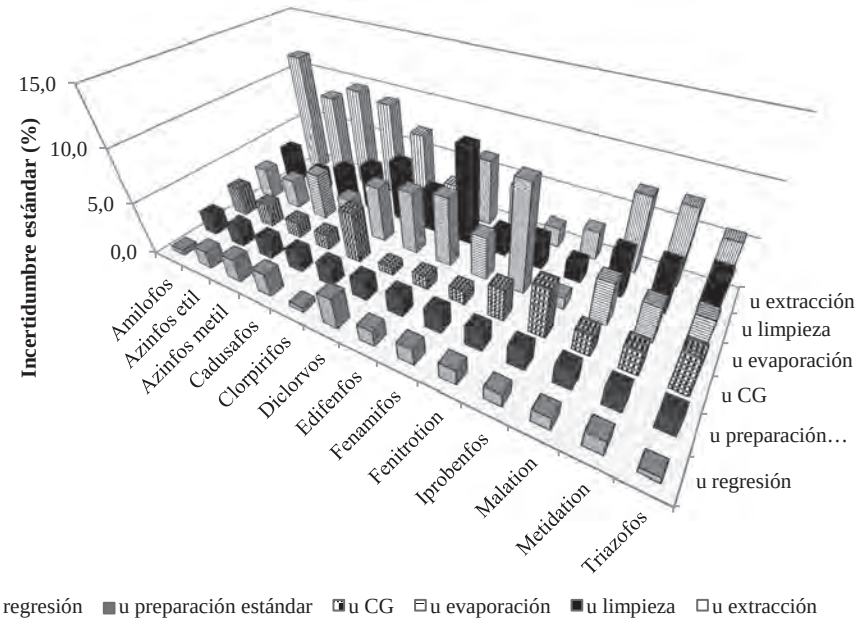

Figura 6. Incertidumbre estándar (u) discriminada por componentes. Método combinado.

ra general se observa que las fuentes que menos aportan a la incertidumbre corresponden a la $u_{preparación\ estándar}$ y a la $u_{regresión}$, lo cual resulta ser otra diferencia respecto a lo encontrado en el método *botton up*, pues para este último método estas fuentes de incertidumbre son las que más aportan a la incertidumbre global.

La Figura 6 indica que la u_{CG} presenta diversos valores; por ejemplo, para compuestos como diclorvos, edifenfos, fenamifos o metilazinfos se presentan valores inferiores al 2%, mientras que para clorpirifos o iprobenfos se tienen valores cercanos al 5%, lo cual resulta ser una fuente más significativa en el cálculo de la incertidumbre global. El aumento en la incertidumbre de estos plaguicidas se atribuye a procesos de descomposición o adsorción de los analitos en el puerto de inyección o en la columna cromatográfica, lo que afecta tanto la exactitud como la repetibilidad de las medidas. Mediante este segundo método la determinación u_{CG} no solo incluye errores que pueda ocasionar el instrumento de medida, sino otras fuentes como la integración de las señales cromatográficas, lo cual le confiere una ventaja a este método respecto al *botton up*, para el cual se tendría que incluir una nueva fuente de incertidumbre mediante experimentos similares al experimento 4.

Asimismo, la Figura 6 muestra que el proceso de evaporación en algunos casos influye de manera notoria sobre algunos compuestos, y en otros casos presenta valores de incertidumbre muy bajos. Para el caso de diclorvos y fenitrotion se encuentran algunos de los valores más altos de $u_{evaporación}$, lo cual se atribuye a pérdidas por volatilización, pues se trata de los compuestos de menor punto de ebullición (cercanos a 140 ºC) de este grupo de plaguicidas. Sin embargo, para el caso de edifenfos se encuentra un punto de ebullición aproximadamente 10 ºC mayor y se tiene un alto valor de $u_{evaporación}$, lo cual se cree es debido a procesos de descomposición adicionales a las pérdidas por volatilización (22). Vale la pena resaltar que para el caso de fenitrotion, fenamifos y diclorvos la fuente que aporta en mayor medida corresponde a la evaporación de la muestra. Al comparar la $u_{evaporación}$ de los dos métodos se halla una gran diferencia, pues mediante el método *botton up* no hay diferencia entre cada uno de los compuestos, mientras que con el segundo método se presenta una incertidumbre diferente con cada compuesto, e incluso se observa una leve correlación con las propiedades fisicoquímicas de los compuestos analizados. Respecto a la $u_{limpieza,}$ al comparar los resultados de la Figura 3 con la 6, se observan diferencias similares que en las demás comparaciones realizadas, mientras que para el caso de la Figura 3, la $u_{limpieza}$ es la menor de las fuentes de incertidumbre; en la Figura 6 se tiene que esta fuente es de las de mayor contribución. Asimismo, esta última figura señala que cada uno de los compuestos presenta valores relativamente diferentes: mientras algunos compuestos como el azinfosmetil o el fenamifos presentan valores cercanos al 2 %, otros como el clorpirifos o el triazofos exhiben valores que superan el 5%. Estas diferencias se cree son debidas a procesos de interacción con la PSA y específicamente a adsorción de los plaguicidas (23).

En general se encuentra que la fuente de incertidumbre que aporta en ma-

yor medida corresponde a la $u_{extracción}$, lo cual correlaciona satisfactoriamente con lo reportado en literatura(16). Sin embargo, como se mencionó anteriormente para fenitrotion, fenamifos y diclorvos, la $u_{extracción}$ no es la fuente principal, sino que,por el contrario, es de las que menos influye en el valor global de la incertidumbre (menos del 3%).

Por último, la Figura 7 muestra el promedio del aporte de cada una de las fuentes a la incertidumbre global para todos los plaguicidas. En esta figura son más evidentes las diferencias entre los dos métodos. Mientras que con el método *botton up* se indica que la regresión y la preparación de los estándares aportan casi un 90% a la incertidumbre global, mediante el método combinado se encuentra que es inferior al 7%. De igual manera, para los procesos de extracción y limpieza mediante el primer método se tiene un aporte de apenas el 0,8%, mientras que el segundo método índica que estas son las fuentes de mayor incertidumbre, cerca al 70%.

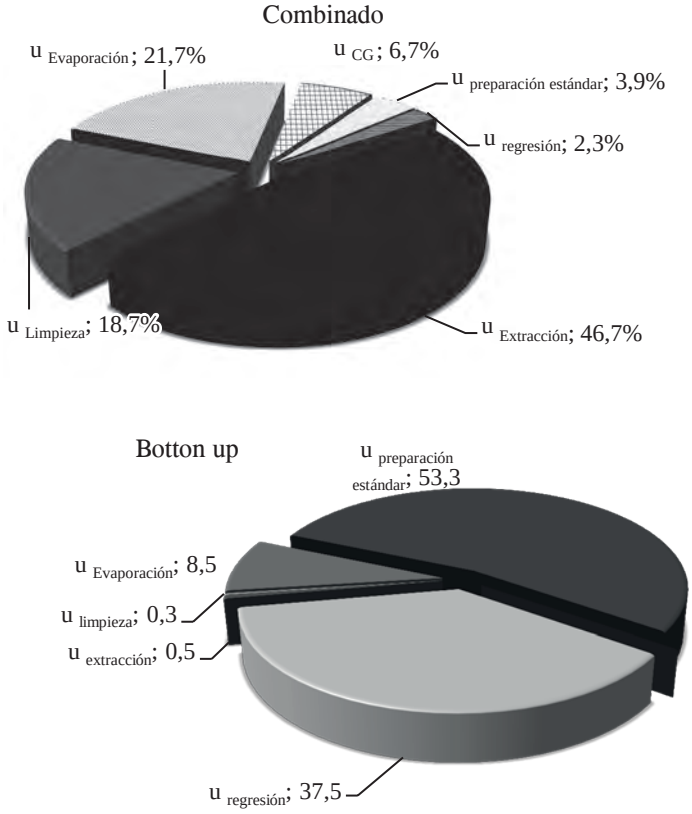

Figura 7. Promedio de la incertidumbre de cada componente (extracción, limpieza, preparación estándares, regresión), obtenido por los dos métodos.

CONCLUSIONES

En este estudio se encontró que la estimación realizada mediante los dos métodos arrojó valores de incertidumbre expandida inferiores al 50% del valor al cual se le determinó la incertidumbre, lo que implica que mediante la metodología en estudio se logran obtener incertidumbres adecuadas para este tipo de determinaciones analíticas.

En la comparación de las dos metodologías, se halló que mediante el método combinado se estiman valores hasta 5 veces más altos a los calculados mediante la aproximación *botton up*. Adicionalmente, con el método combinado se logran obtener resultados más acordes con los reportados en la literatura. Por otro lado, mediante el método combinado se obtuvieron valores de incertidumbre que representan de una manera más adecuada todas las etapas del proceso analítico, hasta tal punto que se observa una relación de los aportes de cada etapa con las propiedades fisicoquímicas de algunos compuestos. Finalmente, mediante el método combinado se encontró que la fuente de incertidumbre que más influye sobre el valor de incertidumbre final corresponde al proceso de extracción, seguido por la limpieza y la evaporación.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros agradecimientos al Ministerio de Desarrollo Agropecuario de Panamá, al Banco Interamericano de Desarrollo y al Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA), Viena, Austria, por la colaboración y financiación suministrada para la realización de este proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Charles, H.; Godfray, J; Beddington, J.; Crute, I.; Haddad, L.; Lawrence, D.; Muir, J.; Pretty, J.; Robinson, S.; Thomas, S.; Toulmin, C. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*. 2010. **327**: 812-818.

2. Nord, M. *Household food security in the United States, 2009*. New Jersey, USA: Diane Publishing. 2010. p. 35.

3. Sanco. *Method Validation and* Quality *Control Procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. 2009. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf

4. Vanatta, L. E.; Coleman, D. E. Calibration, uncertainty, and recovery in the chromatographic sciences. *Journal of Chromatography A*. 2007. **1158**: 47-60.

5. ISO/IEC. *Norma Técnica Colombiana IEC/ISO 17025: 2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración*. Bogotá, D. C., Colombia: Icontec. 2005. p. 26.

6. VIM, III. *International vocabulary of basic and general terms in metrology (VIM)*. International Organization for Standardization. 2012. pp. 25-27.

7. Maroto, A.; Boqué, R.; Riu, J.; Xavier Rius, F. Estimation of measurement uncertainty by using regression techniques and spiked sam-

ples. *Analytica Chimica Acta*. 2001. **446**: 131-143.

8. Alder, L.; Korth, W.; Patey, A. L.; Schee, H.; Schoeneweiss, S. Estimation of measurement uncertainty in pesticide residue analysis. *Journal of AOAC International*. 2001. **84**: 1569-1578.

9. BIPM, IFCC, IUPAC. OIML, *Evaluation of measurement data –Guide to the expression of uncertainty in measurement*. 2008. Disponible en: http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf

10. Ellison, S.; Williams, A. *EURACHEM / CITAC Guide CG 4: Quantifying uncertainty in analytical measurement*. 2012. Disponible en: http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf

11. Wallace, J. Ten methods for calculating the uncertainty of measurement. *Science & Justice*. 2010. **50**: 182-186.

12. Theodorou, D.; Meligotsidou, L.; Karavoltsos, S.; Burnetas, A.; Dassenakis, M.; Scoullos, M. Comparison of ISO-GUM and Monte Carlo methods for the evaluation of measurement uncertainty: Application to direct cadmium measurement in water by GFAAS. *Talanta*. 2011. **83**: 1568-1574.

13. Lecomte, F.; Huberta, C.; Demarchea, S.; De Bleyea, C.; Dispasa, A.; Jostc, M.; Frankennec, F.; Ceccatob, A.; Rozeta, E.; Huberta, P. Comparison of the quantitative performances and measurement uncertainty estimates obtained during method validation versus routine applications of a novel hydrophilic interaction chromatography method for the determination of cidofovir in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012. **57**: 153-165.

14. Lisinger, T. Use of recovery and bias information in analytical chemistry and estimation of its uncertainty contribution. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2008. **27**: 916-923.

15. Maroto, A.; Boqué, R.; Riu, J.; Xavier Rius, F. Evaluating uncertainty in routine analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2009. **18**: 577-584.

16. FAO/IAEA. Comparison of Methods for the Estimation of Measurement Uncertainty for an Analytical Method for Sulphonamides. *Activities Report*. 2006. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf

17. Stepan, R.; Hajslova, J.; Kocourek, V.; Tich, J. Uncertainties of gas chromatographic measurement of troublesome pesticide residues in apples employing conventional and mass spectrometric detectors. *Analytica Chimica Acta*. 2004. **520**: 245-255.

18. Codex Alimentarius. Norma CAC/GL 59 –Directrices sobre la estima-

ción de la incertidumbre de los resultados. 2006. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf

19. Galbán, J.; Ubide, C. Uncertainty due to the quantification step in analytical methods. Talanta. 2007. **71**: 1339-1344.

20. Maroto, A.; Boqué, R.; Riu, J.; Xavier Rius, F. Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process. *Analytica Chimica Acta*. 1999. **391**: 173-185.

21. Hund, E.; Massart, D.; Smeyers-Verbeke, J. Comparison of different approaches to estimate the uncertainty of a liquid chromatographic assay. *Analytica Chimica Acta*. 2003. **480**: 39-52.

22. Kocourek, V.; Hajlová, J.; Holadová, K.; Poustka, J. Stability of pesticides in plant extracts used as calibrants in the gas chromatographic analysis of residues. *Journal of Chromatography A*. 1998. **800**: 297-304.

23. Li, L.; Li, W.; Ge, J.; Wu, Y.; Jiang, S.; Liu, F. Use of graphitic carbon black and primary secondary amine for determination of 17 organophosphorus pesticide residues in spinach. *Journal of Separation Science*. 2008. **31**: 3588-3594.