

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS EN CAFÉ VERDE POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDES IN GREEN COFFEE BY GAS CHROMATOGRAPHY

David Dallos Corredor* y Jairo Arturo Guerrero Dallos*

Recibido: 15/09/05 – Aceptado: 10/12/05

RESUMEN

En este estudio se describe la implementación y validación de una metodología multirresiduo para la determinación de plaguicidas organoclorados, organofosforados y piretroides en café verde. Los plaguicidas se extrajeron con una mezcla de solventes acetona-agua (2:1) seguida de una partición con acetato de etilo-ciclohexano (1:1). Los extractos se limpiaron posteriormente por cromatografía de permeación en gel para eliminar principalmente grasa y cromatografía en minicolumna sobre silicagel para eliminar otros interferentes. La determinación analítica se realizó por cromatografía de gases de alta resolución con inyección *splitless* pulsada y detección simultánea por microcaptura electrónica (μ -ECD) y nitrógeno-fósforo (NPD) acoplados en paralelo. La metodología es específica, selectiva, precisa y exacta. Los porcentajes de recuperación de la mayoría de los compuestos estuvieron entre 70 y 110%

al fortificar con mezcla de plaguicidas entre 0,038 y 1,536 mg/kg con límites de cuantificación entre 0,011 y 0,100 mg/kg.

Palabras clave: plaguicidas, café, cromatografía de gases, limpieza, validación.

ABSTRACT

This study describes the implementation and validation of a multiresidue methodology for the determination of organochlorine, organophosphorus and pyrethroids pesticides in green coffee. Pesticides residues were extracted from green samples with an acetone-water (2:1) mixture followed by ethyl acetate-cyclohexane (1:1) partitioning. The clean up steps include gel permeation chromatography and mini column chromatography using silicagel. Final determination was carried out by high resolution gas chromatography with a pulsed splitless injection mode and si-

* Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Ciudad Universitaria, Bogotá, D. C., Colombia. Correo electrónico: jaguerrero@unal.edu.co

multaneous detection by μ -ECD and NPD coupled in parallel. The methodology is specific, selective precise and accurate. Recoveries of majority of pesticides from spiked samples range from 70 to 110% at fortification levels of 0.038 mg/kg-1.536 mg/kg with limit of quantitation between 0.011 mg/kg and 0.100 mg/kg.

Key words: pesticides, coffee, gas chromatography, clean up, validation.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad Colombia es el tercer productor mundial de café, después de Brasil y Vietnam, y el primer productor de café suave; la producción total de acuerdo con el anuario estadístico del Ministerio de Agricultura para el año 2001 fue de 10.939.000 sacos de 60 kilos que corresponden a 656.160 toneladas, y una superficie plantada de 830.000 hectáreas con un rendimiento promedio de 791 kg/ha. La Figura 1 esquematiza la producción de café en Colombia en relación con la producción mundial en 2002 (1).

El café producido en el país no sólo satisface el consumo nacional sino que es el primer producto de exportación, el cual tiene como destino los mercados

de Estados Unidos, algunos países europeos y Japón.

En el cultivo, almacenamiento y transporte del café se usan plaguicidas, como insecticidas, herbicidas, nematocidas, fungicidas, que si no se aplican de manera controlada podrían quedar residuos en el producto final; estos residuos tienen unos límites máximos permitidos de acuerdo con parámetros internacionales, por encima de los cuales podrían afectar la salud humana. Los límites máximos de residuos (LMR) establecidos por cada país se basan en el Codex Alimentarius (2), la Environmental Protection Agency (3) o legislaciones propias de los países.

De esta manera se hace importante desarrollar metodologías confiables y reproducibles que garanticen que nuestro café no supere los LMR y que se produzcan productos inocuos y de buena calidad tanto para el consumidor nacional como para exportación.

Existen en la actualidad metodologías para la determinación de residuos de plaguicidas en diferentes matrices (4, 5), pero éstas en su mayoría usan solventes de alta toxicidad, como diclorometano, tolueno, etc. Por eso en este documento se presenta la implementación y validación de una metodología usando solventes menos tóxicos y más amigables con el medio ambiente (6, 7, 8). Es importante destacar el hecho de que se trata de una metodología multi-residuo en la que se determinan 14 plaguicidas simultáneamente y que éstos son los de mayor importancia para el caso del café, pues son los más aplicados por nuestros caficultores.

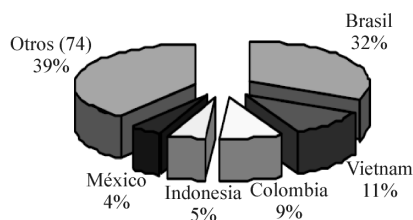


Figura 1. Producción mundial de café en año 2002 (1).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales de referencia, reactivos y soluciones

Los materiales de referencia de plaguicidas con porcentajes de pureza entre 98 y 100% se obtuvieron del Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania). El acetato de etilo, ciclohexano, acetona grado residuos de plaguicidas, bicarbonato de sodio, sílica gel (60-200 mesh) grado analítico y sulfato de sodio anhidro grado residuos se obtuvieron de J. T. Beaker y Mallinckrodt. Se prepararon soluciones madre de los materiales de referencia en concentración cercana a 1.000 $\mu\text{g/mL}$ en acetato de etilo, los cuales se almacenaron en congelador a -20 °C. Las mezclas de los plaguicidas se prepararon en concentraciones entre 2,56 y 102,40 $\mu\text{g/mL}$.

Obtención y preparación de la muestra blanco

La muestra de café blanco se adquirió en la Cooperativa de Caficultores del Alto Occidente de Caldas, ubicada en el municipio de Ríosucio, Caldas, Colombia; el café provenía de una finca certificada para la producción de café orgánico.

El proceso de molienda se llevó a cabo en un molino eléctrico convencional; sin embargo fue necesario utilizar hielo seco triturado en proporción 1:1 para evitar el calentamiento excesivo de la matriz y la posible degradación o pérdida de los plaguicidas. Posteriormente el café se pasó a través de una malla de 1 mm con el propósito de obtener un tamaño particulado bajo, ya que la eficiencia en el proceso de extracción depende del tamaño de la par-

tícula, así el solvente de extracción tiene acceso a mayor cantidad de material cuando el tamaño de la partícula es inferior. La muestra se mantuvo refrigerada a 4 °C durante el tiempo de desarrollo de la metodología para evitar cualquier cambio en la matriz.

Plaguicidas a determinar

En la selección de los plaguicidas a analizar se tuvieron en cuenta los estándares internacionales de residuos de plaguicidas en café, como el Codex Alimentarius, la EPA y la legislación del Japón para límites máximos de residuos (LMR). También se tuvieron en cuenta los plaguicidas aplicados en el país al cultivo de café, los cuales se establecieron por medio de una encuesta a caficultores del municipio de Anserma y Ríosucio, Caldas, Colombia; se consultó también a los técnicos cafeteros del comité de cafeteros de los municipios mencionados, y se obtuvo información de los plaguicidas adquiridos por los campesinos en los almacenes del Cafetero.

Tabla 1. Plaguicidas usados por los caficultores del Alto Occidente de Caldas, Colombia

Nombre comercial	Compuesto activo	Tipo
Glifosol	Glifosato	Herbicida
Roundup	Glifosato	
Estelar	Glifosato	
Goal	Glifosato	
Furadan 3 GR	Carbofuran	Nematicida
Nemacur 10 GR	Fenamifos	
Thiodan 35 EC	Endosulfan*	Insecticida
Actellic 50 EC	Pirimifos metil	
Sumithion 50 EC	Fenitrotion	
Lorsban 4 EC	Clorpirifos	
Fentopen 500 EC	Fentoato	
Levaycid 500 EC	Fention	

* Prohibido en Colombia.

La Tabla 1 muestra los plaguicidas utilizados por los caficultores en algunos municipios del Alto Occidente de Caldas, Colombia. Entre los plaguicidas aplicados en el cultivo de café se encuentra el endosulfan, el cual fue prohibido en Colombia mediante la resolución 1311 de 21 de junio de 2001 del ICA; sin embargo, su eficiencia en el control de la broca hace que aún se utilice.

No es posible analizar por cromatografía de gases algunos de los plaguicidas referenciados en los estándares internacionales y aplicados en café, de manera que no fueron objeto de nuestro estudio. El fentión, un insecticida utilizado para el control de la broca, no se incluyó en el estudio ya que se degrada a fentión sulfóxido y fentión sulfona principalmente, por lo que su análisis y estudio requiere otro tipo de diseño experimental. La Tabla 2 muestra los plaguicidas involucrados en la metodología y su clasificación.

Instrumentación

Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 Plus con inyector automático 7683 Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EUA), con control electrónico de pre-

Tabla 2. Plaguicidas involucrados en la metodología y su clasificación

Organoclorados	Organofosforados	Piretroides
γ -HCH	Diclorvos	Permetrina
Endosulfan	Monocrotofos	Cipermetrina
p,p'-DDT	Dimetoato	Deltametrina
	Clorotalonil	
	Malation	
	Clorpirifos	
	Fenitroton	
	Fentoato	
	Fenamifos	

sión, equipado con un detector de microcaptura electrónica μ -ECD ^{63}Ni y un detector de nitrógeno-fósforo NPD acoplados en paralelo mediante un divisor de flujo (Y) de borosilicato al final de una columna capilar HP-5 (30 m $\times$ 0,35 mm d.i., df 0,25 μm). Inyector automático 7683. Las condiciones cromatográficas utilizadas en el análisis de los plaguicidas fueron las siguientes: volumen de inyección 2 μL ; inyección en modo *splitless* pulsado con presión de pulso de 60 psi durante 1,0 min; tiempo de purga de 1,0 min, flujo de purga de 50 mL/min y temperatura del inyector de 250 $^{\circ}\text{C}$. El gas de transporte fue nitrógeno y se utilizó una rampa de flujo. El programa de temperatura se muestra en la Figura 2. La temperatura del detector μ -ECD fue 300 $^{\circ}\text{C}$ con flujo de nitrógeno de 10 mL/min como gas auxiliar. El detector NPD se trabajó a 310 $^{\circ}\text{C}$ con flujos de gas auxiliar de 10 mL/min, de H_2 de 3 mL/min y de aire de 60 mL/min. En el proceso de extracción y limpieza se utilizaron un homogeneizador Stephan Blender 2010, un homogeneizador de alta velocidad Ultraturrax

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Variación ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	Tiempo total (min)
50	10	0
130	2	8
180	10	33
250	2	40
300	---	65

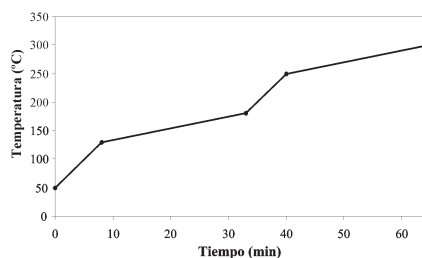


Figura 2. Rampa de temperatura usada para la determinación de los plaguicidas.

T25 (IKA), un evaporador rotatorio Buchi R-114 y un equipo de GPC KL-SX-3 de Redemend Bt, este último empacado con un polímero de estireno-divinilbenceno a 3 % de entrecruzamiento. Las condiciones en este equipo fueron: solvente de elución acetato de etilo-ciclohexano (1:1); flujo de elución 1 mL/min.

Procedimiento de extracción

Con el objetivo de desarrollar un procedimiento de extracción y limpieza adecuado, fue necesario considerar las características de la matriz, ya que dependiendo de la composición de ésta se selecciona el solvente de extracción y los métodos de limpieza (9); la Tabla 3 muestra la composición general del café verde (10).

En algunas metodologías se usan mezclas acetona-agua en diferentes proporciones para la extracción de plaguicidas en matrices sin grasa o con bajo contenido de ésta (11); en el desarrollo de este proceso se usó una mezcla acetona-agua (2:1). Posteriormente se realizó un proceso de partición entre la fase acuosa (acetona-agua) y una mezcla de acetato de etilo-

lo-ciclohexano (1:1) (12); para evitar la formación de emulsiones se evaporó primero la acetona y posteriormente se realizó la partición.

Procedimiento de limpieza

Para eliminar la grasa presente en la matriz se realizó primero una limpieza por cromatografía de permeación en gel (GPC), utilizando como solvente de elución una mezcla de acetato de etilo ciclohexano (1:1) a un flujo de 5 mL/min y se recogió la fracción de plaguicidas entre 50 y 90 mL. Posteriormente se realizó un proceso adicional mediante una minicolumna empacada con un gramo de sílica gel (13) y se encontró que la elución con la mezcla ciclohexano-acetona-acetonitrilo (86:10:4) presentaba porcentajes de recuperación adecuados para los plaguicidas en estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción

Después de molido el café y pasado por la malla, se toman 20 g de muestra, se adicionan 48 mL de agua y se dejan reposar durante 15 minutos, posteriormente se adicionan 100 mL de acetona y se homogeniza durante 2 minutos a una velocidad de 14.000 rpm en ultraturrax. Se deja reposar el extraído durante 30 minutos y se filtran 80 mL medidos en probeta a través de un algodón, se pasa la solución a un balón y se concentra en evaporador rotatorio hasta que la acetona se haya evaporado completamente.

Tabla 3. Composición general del café verde

%	Café verde	
	Mínimo	Máximo
Agua	8,0	12,0
Cafeína	0,8	1,8
Grasa	11,4	14,2
Azúcares	5,8	7,8
Celulosa	16,6	42,3
Nitrógeno	1,1	2,2
Proteína	6,9	13,7
Ceniza	3,5	4,0

Partición

Posteriormente se pasa la solución acuosa a un embudo de decantación de 250 mL y se adicionan 15 mL de solución de NaCl al 15%. Se extrae con tres porciones de mezcla acetato de etilo-ciclohexano (1:1). Se recogen las fracciones orgánicas y se pasan a través de una columna empacada con 20 g de Na_2SO_4 (anhidro), se lava la columna con 5 mL de mezcla acetato de etilo-ciclohexano, se concentra la solución en el evaporador rotatorio a una temperatura de 37 °C hasta aproximadamente 5 mL, se pasa cuantitativamente el contenido del balón a un matraz de 10 mL, se lava con mezcla acetato de etilo-ciclohexano y se afora a volumen.

Limpieza en GPC

Se inyectan 2,5 mL y se eluye a un flujo de 5 mL/min, se desecha la fracción de 0-50 mL, se toma la fracción de 50-90 mL, se concentra en evaporador rotatorio hasta casi sequedad.

Limpieza en silica gel

Se dispone una columna con 1,0 g silica gel desactivada (1,5% de agua) y 0,3 g de Na_2SO_4 anhidro, se acondiciona con una mezcla de ciclohexano-acetona-acetonitrilo (86:10:4), se transfiere la muestra a la columna y posteriormente se eluye con un volumen de la misma mezcla; se concentra en el evaporador rotatorio hasta casi sequedad, se transfiere cuantitativamente a un balón de 2,0 mL con acetato de etilo y se afora.

Validación de la metodología

Una vez se establecieron las condiciones adecuadas de separación cromatográfica, extracción y limpieza, se validaron los parámetros de especificidad-selectividad, precisión, linealidad, cantidad mínima detectable, cantidad mínima cuantificable, exactitud y robustez (9, 14, 15, 16).

Especificidad-selectividad

Se inyectaron extractos de café blanco y extractos de blanco fortificado al nivel dos de la curva de calibración. Las Figuras 3 y 4 muestran los cromatogramas de la matriz blanco y de la matriz blanco fortificada, respectivamente. Compuestos como dimetoato o diclorvos, en los cuales hubo pequeñas interferencias por μ -ECD, no presentaron ninguna interferencia por NPD. Por tanto, la metodología demuestra que es específica y selectiva puesto que permite separar adecuadamente las señales de los analitos de los interferentes de la matriz. La Tabla 4 muestra la resolución y el tiempo de retención de cada uno de los picos de los plaguicidas en extracto de matriz. Es importante ver que los plaguicidas que tienen una resolución menor de 1,5 por un detector, muestran una resolución mayor por el otro detector.

Efecto matriz

El efecto matriz se evaluó determinando si las señales de los plaguicidas obtenidas en solvente y en matriz son significativamente diferentes. Este efecto se evaluó por el método de la regresión lineal graficando la señal del analito en matriz en función de la señal del analito en solvente

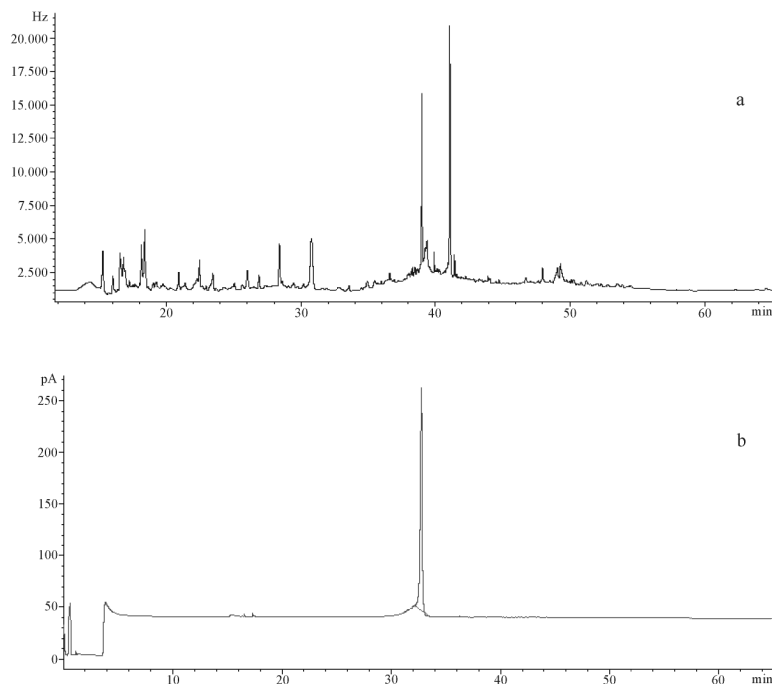


Figura 3. Cromatogramas del blanco de café verde. a) detector μ -ECD, b) detector NPD.

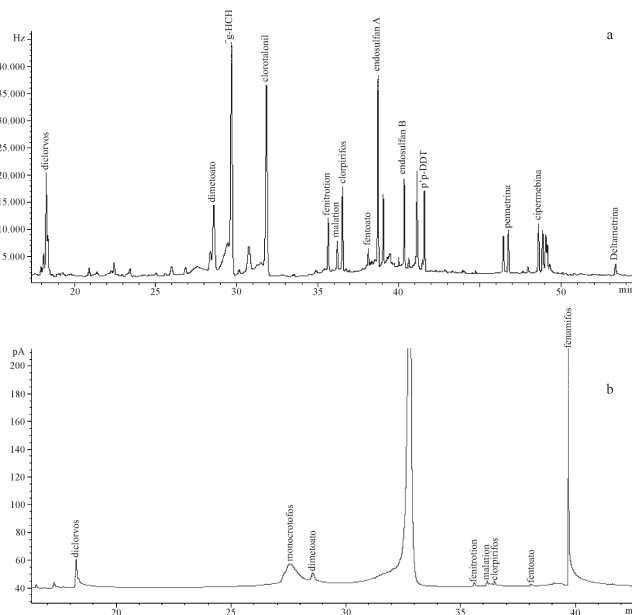


Figura 4. Cromatogramas del blanco de café verde fortificado al segundo nivel de calibración. a) detector μ -ECD, b) detector NPD.

Tabla 4. Resolución, tiempos de retención, rango de calibración y coeficientes de correlación de los plaguicidas en blanco fortificado

Nombre	Detector	Tiempo de retención (min)	Resolución con picos vecinos	Rango de calibración $\mu\text{g/mL}$	Coefficientes de correlación
Diclorvos	NPD	18,3	>2	0,270 – 1,354	0,994
Diclorvos	ECD	18,3	1,7 y 1,1	0,270 – 1,354	0,994
Monocrotofos	NPD	27,6	>2	0,875 – 4,374	0,991
Dimetoato	ECD	28,6	1,3	0,129 – 0,643	0,989
Dimetoato	NPD	28,6	>2	0,129 – 0,651	0,987
γ -HCH	ECD	29,7	>2	0,081 – 0,407	0,990
Clorotalonil	ECD	31,9	>2	0,064 – 0,321	0,985
Fenitroton	NPD	35,7	>2	0,034 – 0,170	0,988
Fenitroton	ECD	35,7	1,2	0,034 – 0,170	0,993
Malation	NPD	36,2	>2	0,052 – 0,260	0,975
Malation	ECD	36,2	>2	0,052 – 0,260	0,991
Clorpirifos	NPD	36,5	>2	0,036 – 0,178	0,971
Clorpirifos	ECD	36,5	>2	0,036 – 0,178	0,990
Fentoato	NPD	38,1	>2	0,034 – 0,168	0,999
Fentoato	ECD	38,1	1,1	0,034 – 0,168	0,995
Endosulfan α	ECD	38,7	>2	0,037 – 0,186	0,994
Fenamifos	NPD	39,7	>2	1,024 – 5,12	0,989
Endosulfan β	ECD	40,3	>2	0,016 – 0,080	0,997
p'p- DDT	ECD	41,6	1,5	0,026 – 0,128	0,987
Permetrina	ECD	46,8	>2	0,255 – 1,274	0,988
Cipermetrina	ECD	48,6	1,2	0,129 – 0,644	0,976
Deltametrina	ECD	53,3	>2	0,026 – 0,131	0,950

(9). Se encontró que existe efecto matriz, por lo cual los compuestos se cuantificaron con curvas de calibración en extracto blanco de café.

Linealidad

Después del proceso de limpieza, tres réplicas del extracto blanco se fortificaron con mezcla de plaguicidas a cinco niveles de concentración, se inyectaron en el cromatógrafo de gases y se construyeron gráficas de área en función de la concentración.

Se encontró que en la mayoría de plaguicidas las curvas de calibración en extracto de matriz analizadas por ambos detectores presentan coeficientes de correlación mayores de 0,99, correlación significativa, pendientes estadísticamente diferentes de cero, regresión significativa, y linealidad, con una confia-

bilidad del 95%. Diclorvos, malation, clorpirifos, fentoato, permetrina y cipermetrina presentaron interceptos estadísticamente diferentes de cero. La Figura 5 corresponde al diclorvos determinado por detector NPD y en la Tabla 4 aparece el rango de calibración de trabajo y los coeficientes de correlación obtenidos.

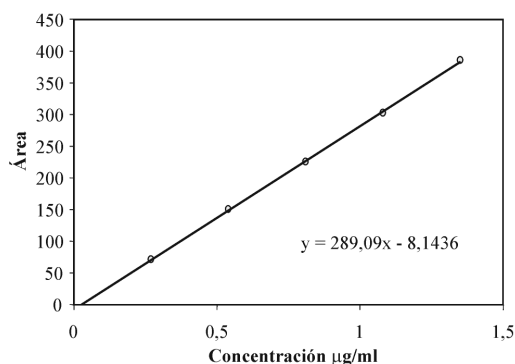


Figura 5. Respuesta de diclorvos en función de la concentración por detector NPD.

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

Los límites de detección y los límites de cuantificación se calcularon teniendo en cuenta 3 y 10 veces el ruido de la matriz blanco respectivamente (9). El experimento se realizó con cinco réplicas. La Tabla 5 presenta los valores correspondientes para cada uno de los plaguicidas en mg/kg, los cuales se verificaron experimentalmente. Estos resultados muestran que el método propuesto en este trabajo es apropiado para determinar residuos de plaguicidas al nivel de los LMR.

Precisión y exactitud

La precisión se evaluó como repetibilidad y como precisión intermedia al segundo nivel de concentración, el cual es el valor más cercano al LMR. En la evaluación de la repetibilidad se realizaron siete experimentos el mismo día bajo las mismas condiciones, mientras que para la evaluación de la precisión intermedia se realizaron cinco experimentos por duplicado en diferentes días.

Las Tablas 6 y 7 muestran el promedio, la desviación estándar y la dispersión de los resultados expresados como porcentaje de coeficiente de variación; tam-

Tabla 5. Límites de detección y límites de cuantificación para la metodología

Plaguicida	Detector	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	LMR* (mg/kg)
Diclorvos	NPD	0,017	0,056	
Dimetoato	ECD	0,022	0,074	
Dimetoato	NPD	0,031	0,062	
γ -HCH	ECD	0,004	0,013	
Clorotalonil	ECD	0,003	0,011	0,20
Fenitrothion	NPD	0,009	0,029	
Fenitrothion	ECD	0,004	0,013	
Malation	NPD	0,009	0,031	
Malation	ECD	0,011	0,018	
Clorpirifos	NPD	0,009	0,030	
Clorpirifos	ECD	0,003	0,011	
Fentoato	NPD	0,007	0,022	
Fentoato	ECD	0,010	0,035	
α -Endosulfan	ECD	0,005	0,017	
Fenamifos	NPD	0,05	0,100	0,10
β -Endosulfan	ECD	0,005	0,015	
p'p- DDT	ECD	0,004	0,015	0,00
Permetrina	ECD	0,074	0,140	0,05
Cipermetrina	ECD	0,065	0,095	0,05
Deltametrina	ECD	0,021	0,024	2,00

* LMR reportados del Codex Alimentarius y la Environmental Protection Agency (EPA).

Tabla 6. Resultados del estudio de repetibilidad

Plaguicida	Det.	Nivel 2 (mg/kg)	% R1	% R2	% R3	% R4	% R5	% R6	% R7	$\bar{\bar{X}}$	s	% CV
Diclorvos	NPD	0,406	79,8	86,3	80,6	80,9	78,7	74,8	71,1	78,9	4,8	6,1
Diclorvos	ECD	0,406	83,4	94,8	83,1	76,6	74,2	77,1	75,3	80,6	7,2	9,0
Dimetoato	ECD	0,193	86,2	98,6	89,1	87,9	94,6	77,5	76,3	87,2	8,2	9,4
Dimetoato	NPD	0,193	87,1	94,1	86,2	88,7	90,2	80,1	76,9	86,2	5,9	6,9
γ -HCH	ECD	0,120	87,6	89,2	83,7	85,2	89,8	67,4	65,8	81,2	10,3	12,6
Clorotalonil	ECD	0,096	84,0	77,0	73,3	80,2	77,0	56,6	57,4	72,2	10,9	15,1
Fenitrotion	NPD	0,050	102,5	100,9	96,2	93,4	95,9	75,5	93,4	94,0	8,9	9,4
Fenitrotion	ECD	0,050	97,6	94,7	97,7	102,4	107,5	82,2	80,7	94,7	9,9	10,5
Malation	NPD	0,078	109,4	108,5	100,6	106,5	102,2	80,4	66,5	96,3	16,4	17,1
Malation	ECD	0,078	106,1	109,4	105,3	105,3	107,9	82,8	78,9	99,4	12,8	12,9
Clorpirifos	NPD	0,053	88,2	86,3	84,7	83,6	77,5	66,3	66,7	79,0	9,2	11,6
Clorpirifos	ECD	0,053	87,9	86,6	84,0	85,1	83,5	70,8	69,6	81,1	7,6	9,3
Fentoato	NPD	0,050	91,2	102,8	98,5	109,8	130,4	101,5	96,8	104,4	12,8	12,3
Fentoato	ECD	0,050	84,9	95,9	111,3	111,8	133,8	109,3	112,1	108,4	15,2	14,0
Endosulfan α	ECD	0,055	80,4	87,8	77,0	77,4	80,7	62,4	57,3	74,7	10,9	14,5
Fenamifos	NPD	1,536	58,7	50,7	40,5	40,9	51,7	51,9	55,3	50,0	6,9	13,8
Endosulfan β	ECD	0,024	90,9	92,1	91,0	89,4	90,4	71,7	68,3	84,8	10,2	12,0
p'-DDT	ECD	0,038	68,4	68,7	67,0	67,5	65,1	56,9	51,2	63,6	6,8	10,7
Permetrina	ECD	0,382	73,1	76,1	68,5	70,5	61,5	57,3	50,9	65,4	9,1	14,0
Cipermetrina	ECD	0,193	105,3	86,1	80,8	81,0	68,2	70,9	62,6	79,3	14,2	17,9
Deltametrina	ECD	0,039	82,9	93,7	83,5	88,1	77,8	78,5	74,4	82,7	6,6	8,0

Tabla 7. Resultados del estudio de precisión intermedia

Plaguicida	Det.	Nivel 2 (mg/kg)	% R1	% R2	% R3	% R4	% R5	$\bar{\bar{X}}$	s	% CV
Diclorvos	NPD	0,406	83,4	81,4	63,5	70,9	78,4	75,5	8,24	10,9
Diclorvos	ECD	0,406	88,9	77,5	58,7	78,5	77,1	76,1	10,9	14,3
Dimetoato	ECD	0,193	93,9	86,1	94,8	77,6	76,6	85,8	8,65	10,1
Dimetoato	NPD	0,193	90,1	91,5	78,1	77,9	77,1	82,9	7,22	8,7
γ -HCH	ECD	0,120	86,4	80,1	93,7	78,4	78,6	83,4	6,59	7,9
Clorotalonil	ECD	0,096	75,1	74,2	68,9	66,6	64,7	69,9	4,59	6,6
Fenitrotion	NPD	0,050	98,5	58,4	98,2	83,5	85,9	84,9	16,3	19,2
Fenitrotion	ECD	0,050	96,2	99,4	91,4	89,6	86,0	92,5	5,3	5,7
Malation	NPD	0,078	104,6	106,7	98,7	86,2	98,0	98,8	7,97	8,1
Malation	ECD	0,078	107,4	102,5	93,6	89,1	97,4	98,0	7,18	7,3
Clorpirifos	NPD	0,053	85,5	80,6	88,5	77,4	86,9	83,8	4,63	5,5
Clorpirifos	ECD	0,053	85,3	79,6	80,6	77,5	77,4	80,1	3,21	4,0
Fentoato	NPD	0,050	100,6	119,7	114,9	117,9	108,1	112,2	7,85	7,0
Fentoato	ECD	0,050	103,6	132,5	117,6	127,5	108,3	117,9	12,3	10,4
Endosulfan α	ECD	0,055	82,4	73,9	73,5	71,2	72,2	74,6	4,45	6,0
Fenamifos	NPD	1,536	45,6	61,6	61,8	53,7	72,1	59,0	9,91	16,8
Endosulfan β	ECD	0,024	91,5	86,2	84,0	79,7	81,4	84,6	4,62	5,5
p'-DDT	ECD	0,038	67,9	65,4	64,9	63,5	62,2	64,8	2,14	3,3
Permetrina	ECD	0,382	72,3	61,9	64,4	61,3	71,9	66,4	5,37	8,1
Cipermetrina	ECD	0,193	83,4	72,0	78,6	71,9	87,7	78,8	6,96	8,8
Deltametrina	ECD	0,039	88,6	72,4	97,0	81,4	85,6	85,0	9,06	10,7

bién se muestra el porcentaje de recuperación para cada experimento.

La variabilidad de los resultados depende de varios factores, entre los que se encuentran la concentración, la sensibilidad del detector al respectivo analito y la estabilidad de éste durante los diferentes pasos de la metodología. Los compuestos en los cuales se obtuvo mayor dispersión en el estudio de repetibilidad fueron clorotalonil, malation, α -endosulfan y cipermetrina, y en el estudio de precisión intermedia fueron fenitrothion por NPD y diclorvos por μ -ECD. Los resultados están dentro de los criterios de aceptación en análisis de residuos de plaguicidas (9). Otros plaguicidas, como el fenamifos, presentan alto % CV debido a su inestabilidad.

La exactitud se evaluó como el porcentaje de recuperación al segundo nivel de calibración. En la mayoría de los plaguicidas los recuperados están dentro de los criterios establecidos en la norma para validación de métodos en análisis de residuos de plaguicidas y drogas veterinarias, es decir, entre 70 y 120% en el rango de concentración estudiado (9). Se encontraron excepciones, como en monocrotofos,

el cual se pierde durante el proceso analítico; el DDT, el fenamifos y la permetrina, los cuales presentaron porcentajes de recuperación menores de 70%. Como se aprecia en las Tablas 6 y 7, los resultados de los porcentajes de recuperación son consistentes tanto en el estudio de repetibilidad como de precisión intermedia.

Robustez

Siguiendo el modelo propuesto por Youden y Steiner (14, 17), se seleccionaron 7 factores determinantes que podrían ser críticos en el desarrollo del método y se hicieron variaciones a los valores nominales de estos factores. Este estudio se realizó al segundo nivel de calibración; para decidir si un parámetro tenía influencia significativa sobre el resultado, se comparó la diferencia de medias obtenida para el cambio efectuado para ese parámetro y el producto de la desviación estándar del estudio de precisión como repetibilidad y raíz de 2. Los resultados mostraron que ninguno de los factores influyó significativamente sobre todos los plaguicidas, lo cual indica robustez del método. La Tabla 8 muestra los factores evaluados en el estudio de robustez.

Tabla 8. Factores evaluados en el estudio de robustez

Factor	Valor nominal	Valor alternativo
Tiempo de matriz en agua	15 minutos	0 minutos
Temperatura del evaporador rotatorio	37 °C	42 °C
Evaporación de acetona	Se evapora	No evaporación
Volumen solvente de partición	80 mL	60 mL
Volumen elución en limpieza con GPC	50-90 mL	55-90 mL
Solvente de inyección	En AcOEt	En Isooctano
Volumen de elución en limpieza con sílica	40 mL	30 mL

Análisis de muestras

Se analizaron muestras suministradas por Café de la Fonda, Bogotá D. C., Colombia, y muestras tomadas en el municipio de Cajete, Cauca, Colombia. Los resultados de los análisis de las muestras aparecen en la Tabla 9.

En una de las fincas se encontraron residuos de clorotalonil por debajo del LMR reportado por la EPA, el cual es de 0,2 mg/kg, mientras que en las fincas donde cultivan café orgánico no se detectaron residuos de plaguicidas, lo que confirmó la autenticidad del cultivo. En el café suministrado por Café de la Fonda tipo consumo nacional se encontraron pequeñas concentraciones de clorpirifos y trazas de endosulfan; aunque este último es prohibido en Colombia, los agricultores todavía lo usan. En el café excelso de exportación y en el café orgánico suministrado por Café de la Fonda se encontraron trazas de clorpirifos. A pesar de

que los resultados encontrados en estas muestras indican unas concentraciones bajas de residuos de plaguicidas y que en ninguna muestra se encontraron residuos que sobrepasaran los LMR, es necesario desarrollar programas de monitoreo de residuos de plaguicidas con el objeto de proteger al consumidor y asegurar la calidad del producto de exportación.

El trabajo desarrollado siguió el sistema de gestión de calidad implementado en el Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, bajo la norma ISO 17025.

CONCLUSIONES

Se desarrolló una metodología multirresiduo para la determinación de residuos de plaguicidas en café verde; se usaron solventes de baja toxicidad y por ende de bajo impacto ambiental. La metodología

Tabla 9. Resultados del análisis de las muestras

Procedencia	Plaguicida	Concentración (mg/kg)
Finca los Naranjos, Cauca	Clorotalonil	0,080 +/- 0,020
Finca la Golondrina, Cauca. Cultivo orgánico	ND	
Finca los Pinos, Cauca. Cultivo orgánico	ND	
Café de la Fonda. Café consumo nacional	Clorpirifos α -Endosulfan β -Endosulfan	0,030 +/- 0,010 Trazas Trazas
Café de la Fonda. Café excelso de exportación	Clorpirifos	Trazas
Café de la Fonda. Orgánico	Clorpirifos	Trazas
ND = No se detectó.		

es confiable y suficientemente sensible para la determinación de residuos de plaguicidas a nivel de los LMR. Esta metodología validada le ofrece al país una herramienta analítica para realizar programas de monitoreo y asegurar la inocuidad respecto al contenido de plaguicidas del café verde tanto de consumo nacional como de exportación.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros agradecimientos al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, y al Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA), Viena, Austria, por la colaboración y financiación para este proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Documento de trabajo N° 29. (2002). La cadena de café en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.
2. Codex Alimentarius. (2000). FAO-OMS. **2B**.
3. US Environmental Protection Agency (EPA). Pesticides and food. (2004). Code of Federal Regulation 40 CFR180.
4. Method development for multiresidues pesticide analysis. (1996). General Inspectorate for Health Protection. Ministry of Public Health, Welfare and Sport. Netherlands.
5. Gelsomino, A. y otros. (1997). Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr.* **782**, 105-122.
6. Montaña, M.; Guerrero, J. A. (2001). Validación de una metodología multiresiduo para la determinación de residuos de plaguicidas en fresa (*Fragaria spp.*) por cromatografía de gases. *Rev. Col. Quím.* **30** (1) 37-46.
7. Moreno, M.; Guerrero, J. A. (2002). Validación de una metodología multiresiduo para la determinación de residuos de plaguicidas en repollo (*Brassica Oleracea var.: Capitata*) por cromatografía de gases. *Rev. Col. Quím.* **31** (1) 19-32.
8. Guerrero, J. A. (2003). Estudio de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas en áreas específicas de Colombia. *Agronomía Colombiana* **21** (3) 198-209.
9. Ambrus, A.; Fajgelj, A. (2000). Principles and practices of method validation. Royal Society of Chemistry. UK.
10. Belitz, Rosch. (1998). Química de Alimentos. Editorial Arabia S. A. 747-760.
11. Pesticide Analytical Manual. (1994). Vol. I, 3a. ed., U.S. Dept. of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Washington D. C. Method for nonfatty foods. Section 302.
12. Specht, W. y otros (1995). Gas-chromatographic determination of pesticide residues after clean-up by gel-permeation chromatography and

- mini-silica gel-column chromatography. *Fresenius Anal. Chem.* **353**, 183-190.
13. Specht, W.; Tilkes, M. (1985). Gas-chromatographische bestimmung von rücsständen an pflanzanbnehandlungsmitteln nach clean-up über gel-chromatographie und mini-kieselgel-säulen-chromatographie. *Fresenius Anal. Chem.* **322**, 443-445.
 14. Quattrocchi, O.; Abelaira de Andri-
zzi, S.; Laba, R. (1992). Introduc-
ción a la HPLC: aplicación práctica.
Argentina: Editorial Artes Gráficas
Farro, pp. 154-173, 301-328.
 15. Ospina de Nigrinis, L. S. (1994). El
método de análisis para los estudios
de estabilidad y de biodisponibilidad
de medicamentos. Parte I. *Revista
Colombiana de Ciencias Quími-
co-Farmacéuticas* **22**, 7-12.
 16. Ospina de Nigrinis, L. S. (1995). El
método de análisis para los estudios
de estabilidad y de biodisponibilidad
de medicamentos. Parte II. *Revista
Colombiana de Ciencias Químico
Farmacéuticas* **23**, 95-100.
 17. Asociación Española de Farmacéuti-
cos de la Industria (AEFI). (2001).
Validación de métodos analíticos.
Sociedad de Validación de Sistemas,
S. L. Barcelona.