

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE RESIDUALIDAD DE PLAGUICIDAS EN AGUACATE HASS

VALIDATION OF A METHOD FOR PESTICIDE RESIDUE ANALYSIS IN HASS AVOCADO

SANTIAGO BENAVIDES ^{a*}, JUAN ECHEVERRI ^b

Recibido 01-09-14, aceptado 09-12-14, versión final 15-12-14.

Artículo Investigación

RESUMEN: El aguacate es una fruta que se caracteriza por su alto contenido de grasas, siendo la variedad Hass la de mayor cantidad de pigmentos y componentes fenólicos, lo que la convierte en una matriz compleja para el análisis de residuos de plaguicidas. Se validó un método para el análisis simultáneo de residualidad de tres plaguicidas en aguacate fresco de la variedad Hass. Se aplicó la técnica QuEChERS siguiendo una modificación del protocolo AOAC 2007.1; para la preparación de las muestras se empleó acetonitrilo acidificado, MgSO₄ y CH₃COONa y se limpiaron por extracción en fase sólida dispersiva con una mezcla de sorbentes: amina primaria secundaria (PSA), octadecilo (C18) y carbón grafitado negro (GCB). Los plaguicidas fueron analizados por GC- μ ECD. En el análisis de linealidad se obtuvieron correlaciones de 0,9908; 0,9968 y 0,9965 para dimetoato, malatión y deltametrina respectivamente y se cumplieron las pruebas de significancia. El efecto matriz provoca una mejora en la sensibilidad de la curva de calibración producto de la concentración de la muestra en la extracción. Se lograron límites de cuantificación de 0,02mg/kg para los tres compuestos con estimaciones de incertidumbre menores al 50%. Se cumplieron los criterios de precisión y exactitud, logrando una validación exitosa.

PALABRAS CLAVE: Aguacate Hass, Análisis de residualidad, QuEChERS, Validación.

ABSTRACT: The avocado is a fruit with a large content of fats and the Hass sort is the one with highest amount of pigments and phenolic compounds, it becomes in a complex matrix for residue pesticides analysis. A multi-residue method for the determination of 3 pesticides in Hass avocado was validated. The QuEChERS technique was applied following a modification of AOAC 2007.1 protocol; samples were extracted with acidified acetonitrile, MgSO₄ and CH₃COONa and cleaned up by dispersive solid phase extraction with a mixture of sorbents: primary secondary amine (PSA), octadecyl (C18) and graphitized carbon black (GCB). The pesticides were analyzed by GC- μ ECD. The linear analysis was obtained correlations of 0,9908 for dimethoate, 0,9968 for malathion and 0,9965 for deltamethrin and significance tests were met. The matrix

^aPracticante Ingeniería Biológica: Escuela de Biociencias, Universidad Nacional de Colombia, Calle 59A No 63 - 20 Medellín, Colombia.

*Email: sbenavidesl@unal.edu.co

^bCoordinador Técnico: Laboratorio de Aguas, CORNARE, Autopista Medellín – Bogotá, Carrera 59 44-48, Kilómetro 54 El Santuario, Colombia.

effect causes an improvement in the sensitivity of the calibration curve for the concentration of product in the extraction sample. The quantification limits for the three compounds was 0,02mg/kg with uncertainty estimates lowers that 50%. The precision and accuracy criteria were met, achieving a successful validation.

KEYWORDS: Hass Avocado, Residue analysis, QuEChERS, Validation.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una tendencia por parte de las autoridades fitosanitarias a exigir la inocuidad de los alimentos, esto con el fin de garantizar la salud de los consumidores. De los diferentes peligros químicos asociados a la producción primaria de alimentos, los plaguicidas y específicamente los residuos que se derivan de su aplicación, se constituyen hoy en día en el principal grupo de atención, es por ello que los análisis de residualidad de plaguicidas están condicionando y condicionaran en el futuro el comercio de estos productos (Torrado, 2006).

Los límites máximos de residualidad de plaguicidas o LMR, son uno de los criterios de aceptación para la comercialización de alimentos, estos son establecidos por organismos internacionales como la FAO, que en su Codex Alimentarius, establece los LMR que puede contener un alimento para que sea apto para consumo humano (WHO y FAO, 2014). Cabe resaltar que los LMR del Codex son sólo una guía, cada país adopta en su legislación cuales son los límites máximos de residualidad de plaguicidas que acepta para alimentos nacionales e importados, siendo éste un concepto legal, que no necesariamente refleja la toxicidad real del plaguicida (Torrado, 2006).

Como se menciona en el documento 3518 del Concejo Nacional de Política Económica y Social (2008), en Colombia sólo se tiene un conocimiento parcial sobre la inocuidad de las frutas, no se cuenta con líneas base que permitan evaluar su contaminación química, se posee una capacidad limitada de laboratorios con acreditación para la evaluación de residuos de plaguicidas y tanto el personal como la infraestructura existente y la capacidad analítica actual son insuficientes para atender la demanda interna.

El aguacate es una fruta que goza de gran demanda a nivel mundial tanto por su sabor, como por sus cualidades nutritivas, desde el 2010 Colombia se sitúa como quinto mayor productor a nivel mundial, siendo el oriente de Antioquia una de las zonas con las mayores tasas de crecimiento anual promedio, debido a que por sus condiciones de clima y altura ha desarrollaron el cultivo de la variedad Hass, que es la de mayor potencial exportador (Yabrudy 2012). Esta fruta se caracteriza por su alto contenido de grasas, siendo la variedad Hass la de mayor cantidad de clorofila, carotenos, poli-fenoles y procianidinas (Wang et al, 2010), lo que implica que es una matriz compleja para el análisis de residuos de plaguicidas.

La cuantificación de plaguicidas en productos frescos supone por lo general dos etapas: una extracción y limpieza de la muestra y una separación en una columna cromatográfica con la posibilidad de utilizar diversas técnicas de detección acopladas (Fenik et al., 2011). Para la extracción y limpieza de la muestra la técnica más utilizada es la de QuEChERS, acrónimo en inglés de Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust and Safe, en esta se emplea para la extracción acetonitrilo, sulfato de magnesio ($MgSO_4$) y el cloruro de sodio ($NaCl$), seguido de la limpieza mediante extracción en fase sólida dispersiva (Anastassiades et al., 2003; Tuzimski, 2014). Para la determinación final, la cromatografía de gases con columna capilar acoplada a un detector de espectrometría de masas (GC-MS) es la más utilizada para la detección, identificación y cuantificación de residuos de plaguicidas en muestras de productos frescos (Walorczyk, 2014), la cromatografía de gases acoplada a detector de microcaptura de electrones (GC- μ ECD) es también muy empleada, especialmente en la detección de plaguicidas organofosforados y piretroides, además los equipos de este tipo tienen menor precio y sus costes de mantenimiento son más bajos, por lo que son más fáciles de obtener en algunos países que los espectrómetros de masas (Oliveira et al., 2014; Hunter, 2010).

Con el ánimo de satisfacer las necesidades de los productores de aguacate de la región y abogar por un mejoramiento de las políticas de inocuidad nacionales, en la Corporación Autónoma Regional de las Cuencas de los Ríos Negro y Nare (CORNARE) junto con su Laboratorio de Aguas, se implementaron y validaron los protocolos para análisis de residualidad de los plaguicidas organofosforados dimetoato y malatión y del plaguicida piretroide deltametrina en aguacate Hass, se analizan estos plaguicidas debido a que son algunos de los más usados en el oriente antioqueño. En la preparación de la muestra y eliminación de interferencias se utilizó la técnica QuEChERS siguiendo una versión modificada del protocolo AOAC 2007.1, para la cuantificación se empleó la técnica de la cromatografía de gases acoplada a detector de micro-captura de electrones (GC- μ ECD) y para la validación se siguió el documento 12571 (2013) de la Dirección General de Salud y Consumidores de la Unión Europea (SANCO) y la guía 49 (2003) de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC).

2. METODOLOGÍA

2.1. Materiales y reactivos

Como matriz se utilizaron aguacates Hass certificados como producto orgánico libre de plaguicidas y suministrados por productores del oriente antioqueño, estos fueron almacenados a $-25^{\circ}C$. Para enriquecer las muestras se emplearon estándares de plaguicidas AccuStandard[®], se prepararon soluciones madre de dimetoato en metanol a una concentración de 4000mg/L, malatión en metanol a una concentración de 10000mg/L y deltametrina en acetona a una concentración de 4000mg/L, la mezcla de plaguicidas se preparó tomando diferentes volúmenes de cada una de las soluciones madre

de cada uno de los compuestos, estas soluciones fueron almacenadas a -25°C . Se usaron los solventes grado cromatografía, acetonitrilo Merck[®] y acetato de etilo J.T. Baker[®], para la acidificación del acetonitrilo se usó ácido acético grado analítico marca Merck[®]. En la preparación de la muestra se utilizaron kits QuEChERS marca Restek[®], para la extracción se empleó el paquete Q150 que contiene 6g de MgSO_4 y 1,5g de NaOAc , para la limpieza se empleó el paquete Q352 que contiene 1200mg MgSO_4 , 400mg PSA, 400mg C18 y 400mg GCB. Para las mediciones volumétricas se utilizó vidriería Brand[®] clase A.

2.2. Equipos e instrumentos

En la preparación de estándares se empleó una balanza analítica de precisión Sartorius[®] modelo CP225D (resolución 0,00001 g). Para homogeneizar la muestra se usó el procesador de alimentos Waring Blander[®] 31BL91 y en el pesaje de la misma se empleó la balanza Ohaus[®] NOB110 (resolución 0,1g). Durante extracción y limpieza se emplearon la centrifuga ClayAdams[®] 0151 y el rotaevaporador Büchi[®] RE111. En la determinación cromatográfica se empleó el equipo Agilent[®] 7890A y para cuantificación de áreas y análisis de cromatogramas se usó el software Open Lab ChemStation versión 01.05, las condiciones de en las cuales se operó el equipo se describe en la Tabla 1.

Tabla 1: Condiciones de operación del cromatógrafo Agilent[®] 7890A

Parámetro	Condición
Volumen de inyección	1 μL
Tipo de inyector	Splitless
Columna	Agilent J&W HP-5, 30 m, 0,32 mm, 0,25 μm GC Column - 19091J-413 Flujo: 12,874 ml/min Presión: 42,407 psi
Horno	T° inicial: 100°C (Retener 0min) T° rampa-1: 300°C (Retener 2min)
Tiempo de corrida	15,333 min
Detector	μECD T°: 300°C Flujo: 30ml/min Señal: 5 Hz/0,04min

2.3. Procedimiento de preparación de muestra

Se implementó una versión modificada del protocolo AOAC 2007.1 adaptándolo a las condiciones del laboratorio y al tipo de muestra. Se siguió el siguiente procedimiento:

1. El día anterior al análisis, se cortó la fruta, se separó la pulpa de la cascara y se llevó al triturador de alimentos. Se pasó la fruta homogenizada a un recipiente y se llevó al cuarto de gravimetría.
2. Se pesaron 15g de muestra en un tubo falcon de 50ml y se almacenaron a -25°C.
3. El día del análisis, se agregó al tubo falcon con la muestra 7 perlas de vidrio y 15ml de acetonitrilo acidulado 1% con una pipeta volumétrica, se agitó durante 1 minuto.
4. Se agregó el Kit QuEChERS de sales extractoras Q150 y se agitó por 1 minuto.
5. Usando un brazo de un mortero cerámico como embolo, se presionó la muestra para separar la fase líquida de la sólida.
6. Con una pipeta graduada se tomó todo el sobrenadante. Se pasaron cantidades iguales (6ml aproximadamente) a dos tubos falcon de 15ml del Kit QuEChERS de separación en fase solida Q352.
7. Se agitó por 30 segundos y se llevó a la centrifugación por 5 minutos.
8. Se retiró todo el sobrenadante de los dos falcon con una pipeta, se pasó a un balón de vidrio que fue llevado al rotaevaporador a 40°C y 180mBar hasta que quedó muy poco líquido, procurando no evaporar todo el solvente. Se retiró y dejó enfriar el balón tapado durante 3 minutos.
9. Se agregó 1 ml de acetato de etilo, se agitó suavemente para que el solvente entrara en contacto con las paredes del balón y con una pipeta volumétrica, se tomó 1ml y se llevó a vial de cromatografía.
10. El vial se llevó al cromatógrafo Agilent®7890A y se analizó por el método descrito en la Tabla 1.

2.4. Validación del método

Durante la validación se siguieron los parámetros de los documentos para el control analítico y validación de métodos SANCO 12571 (2013) de la Unión Europea y la guía IUPAC 49 (2003). Se evaluó linealidad, efecto matriz, límites de cuantificación, porcentajes de recuperación, repetibilidad del método y se estimó la incertidumbre de la medición.

2.4.1. Análisis de linealidad

Se construyó una curva de calibración que correlaciona la concentración de plaguicida en la matriz de aguacate con el área de los picos identificados por el equipo de cromatografía y se realizó una regresión lineal. Se partió de soluciones de los tres plaguicidas en acetato de etilo

preparadas en balones de 10ml con las cuales se enriquecieron las muestras de aguacates a diferentes concentraciones conocidas en un intervalo entre 10 y 0,02 mg de plaguicida por kilogramos de muestra, se inyectaron en el cromatógrafo siguiendo el protocolo de extracción, todas las concentraciones fueron preparadas y analizadas por duplicado. De la curva se descartaron los valores que mediante el análisis de residuales superaron el intervalo de más o menos la desviación estándar de los residuales multiplicado por el t-student, con una confianza del 95% (+Sx/y*t). Se realizó el análisis de linealidad con una prueba de significancia ($\alpha=0,05$) para pendiente (b) e intercepto (a): la desviación estándar de la pendiente (Sb) debe ser mayor al valor de t y el intervalo de confianza para el intercepto ($a \pm Sa*t$) debe contener el cero. Las expresiones (1), (2) y (3) muestran como calcular las desviaciones estándar de residuales, pendiente e intercepto respectivamente.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}, \quad (1)$$

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}, \quad (2)$$

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}. \quad (3)$$

Donde y_i es el área del pico i-ésima de cada nivel de la curva de calibración, \hat{y}_i es el área del pico i-ésima predicha por la regresión lineal de la curva de calibración, x_i es la concentración i-ésima de cada nivel de la curva de calibración; \bar{x} es el promedio de las concentraciones de los niveles de la curva de calibración. n es el número de mediciones.

2.4.2. Efecto matriz

Se construyó una curva de calibración que correlaciona la concentración de plaguicida en la solución de acetato de etilo con el área de los picos identificados por el equipo de cromatografía. En balones de 10ml se prepararon soluciones de diferentes concentraciones de los tres plaguicidas en acetato de etilo en un intervalo entre 10 y 0,001 mg de plaguicida por litro de solvente. En una gráfica se comparó la curva de plaguicidas en acetato de etilo con la curva de plaguicidas en matriz de aguacate de la sección 2.1 con la finalidad observar los efectos de la matriz y el proceso de preparación de muestra sobre la detección del plaguicida.

2.4.3. Límite de cuantificación

Se prepararon cinco extracciones diferentes adicionadas con la mínima concentración de cada plaguicida detectadas por el equipo y se inyectaron en el cromatógrafo. Se espera que el coeficiente de variación de cada plaguicida entre todas las réplicas sea inferior al 15%, en caso contrario se

aumenta la concentración y se repiten las réplicas hasta alcanzar el coeficiente de variación deseado. A la concentración inferior donde el plaguicida presenta un coeficiente de variación inferior al 15 % se le conoce como límite de cuantificación del método y debe ser menor a igual al LMR de cada plaguicida.

2.4.4. Exactitud - Porcentaje de recuperación

Se seleccionaron dos niveles de concentración, 1mg/kg y 0,25mg/kg, para cada uno se realizaron tres replicas de preparaciones de muestras de los tres plaguicidas en matriz de aguacate, se analizaron en el cromatógrafo y se compararon contra los datos arrojados por la curva de calibración de la sección 2.1 observando el porcentaje de recuperación (4). Para la correcta validación del método debe estar en intervalo entre 70 y 120 %.

$$\%Recuperación = \frac{x}{\hat{x}} * 100. \quad (4)$$

Donde x es la concentración teórica del analito adicionada a la muestra, \hat{x} es la concentración calculada del analito por medio de la regresión lineal de la curva de calibración.

2.4.5. Precisión

Usando los dos niveles de concentraciones de la sección 2.4 se realizaron, por mismo analista y a igual hora del día tres preparaciones de muestras para cada plaguicida en matriz de aguacate y se analizaron en el cromatógrafo. El coeficiente de variación de las tres réplicas debe ser inferior al 20 %.

2.4.6. Estimación de incertidumbre

Para la determinación de la incertidumbre se siguió el método botton up, 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 global (Ellison y Williams, 2012; Ahumada et al., 2012). En este estudio se tuvieron en cuenta las siguientes fuentes:

- Extracción de los analitos (u_{extrac}): peso de la muestra de 15,0g \pm 0,1g y adición de 15,00ml \pm 0,03ml de solvente.
- Evaporación de la muestra (u_{evap}): volumen final de 1,000ml \pm 0,008ml.
- Preparación de estándares y dilución (u_{prep}): primero, preparación de la solución madre, estándar aforado a un volumen de 25,00ml \pm 0,04ml; segundo, preparación de soluciones intermedias aforando a 10,00ml \pm 0,025ml; y preparación de mezcla de plaguicidas donde se afora a 10,00ml \pm 0,025ml.

- Regresión para la curva de calibración (u_{reg}): se prepararon 8 niveles de concentración, los cuales correspondieron a 10mg/kg, 5mg/kg, 1mg/kg, 0,5mg/kg, 0,25mg/kg, 0,1mg/kg, 0,05 mg/kg, y 0,025 mg/kg. El aporte a la incertidumbre proveniente de la regresión lineal empleada se determina mediante la expresión (5).

$$u_{reg} = \frac{S_{x/y}}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{q} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (5)$$

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 ($p = 2$); q el número de puntos en la curva ($q = 8$); x_0 la concentración estimada; x_i la concentración i -ésima de cada nivel de la curva de calibración; \bar{x} el promedio de las concentraciones de los niveles de la curva de calibración. Finalmente la incertidumbre global (U_g) se calcula como la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de cada fuente de incertidumbre. En el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos se permiten valores de incertidumbre expandida de hasta el 50 % del valor determinado.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Extracción y limpieza

Los cromatogramas de GC- μ ECD muestran que a pesar del proceso de extracción y limpieza se siguen presentando interferencias producidas por la matriz, no obstante estas interferencias poseen tiempos de retención diferentes a los de los tres plaguicidas analizados y los resultados del protocolo modificado son satisfactorios. La Figura 1 muestra la comparación entre los cromatogramas de la muestra libre de plaguicidas y una muestra enriquecida.

3.2. Análisis de linealidad

La Tabla 2 muestra los resultados del análisis de residuales, al no cumplir el criterio aceptación de la sección 2.4.1 se descartaron los valores en los que los residuos estuvieron fuera del intervalo ± 161082 para dimetoato, ± 100245 para malatión y ± 95885 para deltametrina. Los datos de una repetición de la concentración de 5mg/kg de dimetoato, de una repetición de la concentración de 5mg/kg y una de 10mg/kg de malatión y una repetición la concentración de 5mg/kg de deltametrina fueron descartados para la curva de calibración indicando que en las concentraciones altas la curva pierde linealidad.

La curva de calibración de dimetoato se estableció con pendiente 306198,0044 e intercepto 19790,9092. Para malatión la curva obtuvo una pendiente de 219137,9001 y un intercepto de -4339,6871. La curva de deltametrina obtuvo una pendiente de 167273,8035 y un intercepto de

18390,2240. El coeficiente de correlación para de los tres plaguicidas superó el 0.99% y para todos se logró el nivel de significancia *t-student* ($\alpha = 0,05$) para pendiente e intercepto.

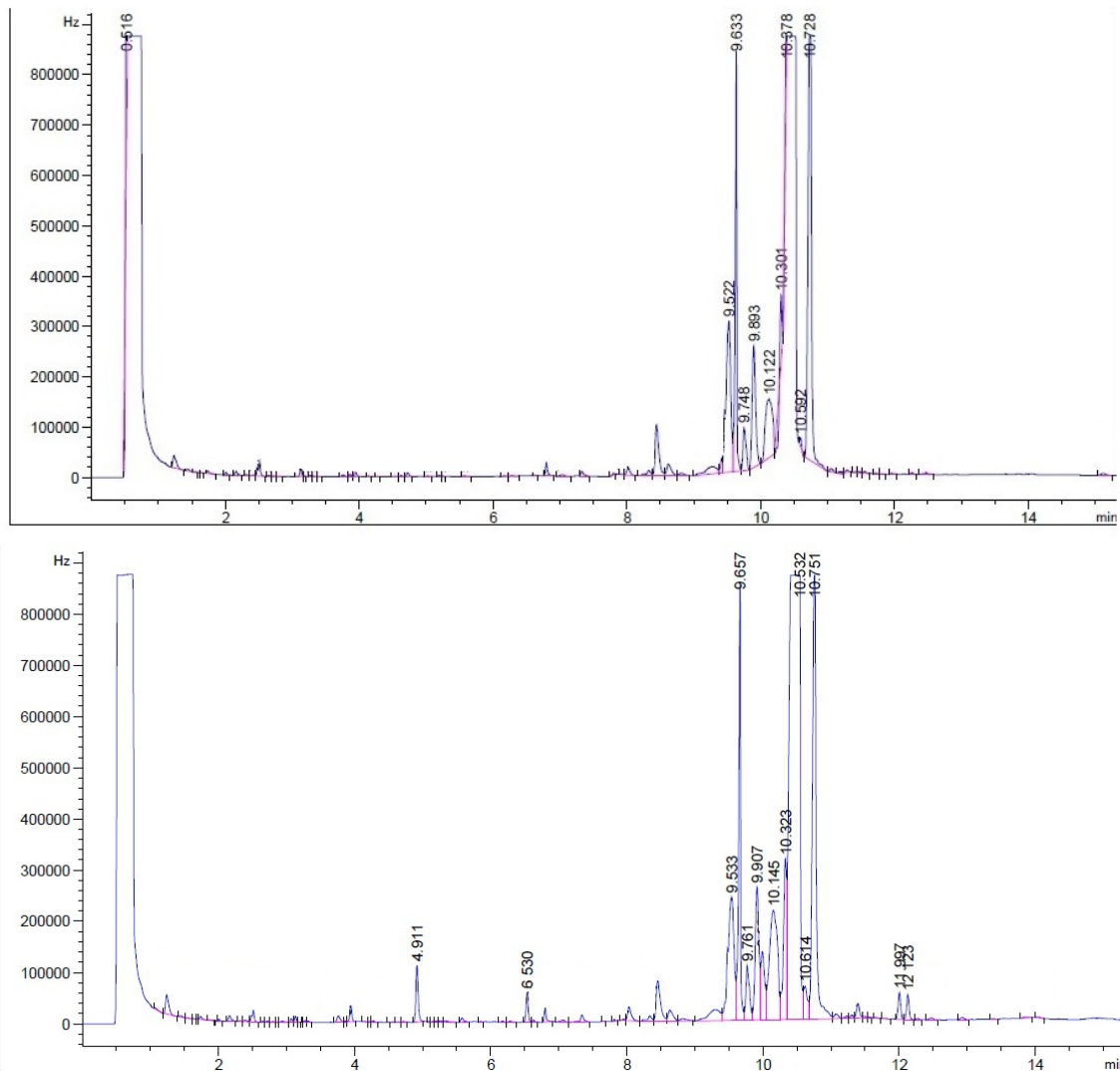


Figura 1: Cromatogramas GC- μ ECD (Hz vs min). Arriba muestra de aguacate Hass libre de plaguicidas. Abajo muestra de aguacate Hass enriquecida con 1mg/kg de plaguicidas, se identifican los picos de dimetoato (4.911min), malatión (6.530min) y deltametrina (11.997 y 12.123 min.)

3.3. Efecto matriz

El efecto matriz provoca una mejora en la sensibilidad de la curva, ocasionada por concentrar la muestra durante el proceso de extracción y limpieza y que se traduce en un aumento de la pendiente de la curva (Figura 2). En el cromatograma inferior de la Figura 1 se observa la división en dos picos de la deltametrina, caso que no se observa con los cromatogramas de deltametrina en acetato

de etilo, esta división de picos provoca que la deltametrina pase de ser el plaguicida con mayor pendiente en soluciones en acetato de etilo, a tener la menor pendiente en matriz de aguacate (Figura 2, C).

Tabla 2: Análisis de residuales en matriz de aguacate

Observación [mg/kg]	Dimetoato		Malatión		Deltametrina	
	Pronóstico [Hz*s]	Residuos	Pronóstico [Hz*s]	Residuos	Pronóstico [Hz*s]	Residuos
10	2666445	43355	1337132	26598	1058279	-94821
10	2666445	-141495	1337132	-111442	1058279	-7019
5	1340936	256994	674949	145125	541505	95381
5	1340936	-55866	674949	27842	541505	105880
1	280528	-21573	145203	-11705	128086	6832
1	280528	7138	145203	2467	128086	5436
0,5	147977	-8312	78984	1040	76408	9611
0,5	147977	-936	78984	-7245	76408	-9143
0,253	82497	-796	46273	524	50880	28654
0,253	82497	-6840	46273	-4431	50880	-6622
0,1	41936	-6444	26010	-6619	35066	-15860
0,1	41936	-12543	26010	-9449	35066	-16171
0,05	28681	-5389	19388	-8054	29899	-14838
0,05	28681	-8385	19388	-8758	29899	-16323
0,0253	22133	-8745	16117	-8824	27346	-18304
0,0253	22133	-9169	16117	-8783	27346	-15599
0,01	18077	-9929	14091	-8410	25764	-17705
0,01	18077	-11065	14091	-9878	25764	-19389

3.4. Límite de cuantificación

Se lograron límites de cuantificación de 0,02 miligramos de plaguicida por kilogramo de aguacate para los tres compuestos, en Colombia la resolución 2906 de 2007 establece los LMR en alimentos para consumo humano y en piensos o forrajes, para aguacate se establecen las restricciones para bromuro inorgánico, metalaxil, tebufenozida, tiabendazol, sin embargo no se cuenta con información nacional sobre los tres plaguicidas de interés. Para estos se consultaron los límites de varias legislaciones internacionales, siendo la legislación europea la más estricta con LMRs de 0.02 para dimetoato, 0,02 para malatión y 0,05 para deltametrina, cumpliendo con el criterio establecido en la sección 2.4.3.

3.5. Exactitud- Porcentaje de recuperación

De los dos niveles de concentración seleccionados: 1mg/kg y 0,25mg/kg, se obtuvieron recuperaciones para dimetoato de 87.44 % y 84.92 % respectivamente, en malatión se lograron recuperaciones de 83.66 % y 100.42 % y para deltametrina se alcanzaron valores de 108.10 % y 101.07 %. Las mejores recuperaciones se logran a la concentración más bajo debido a la menor linealidad de la curva

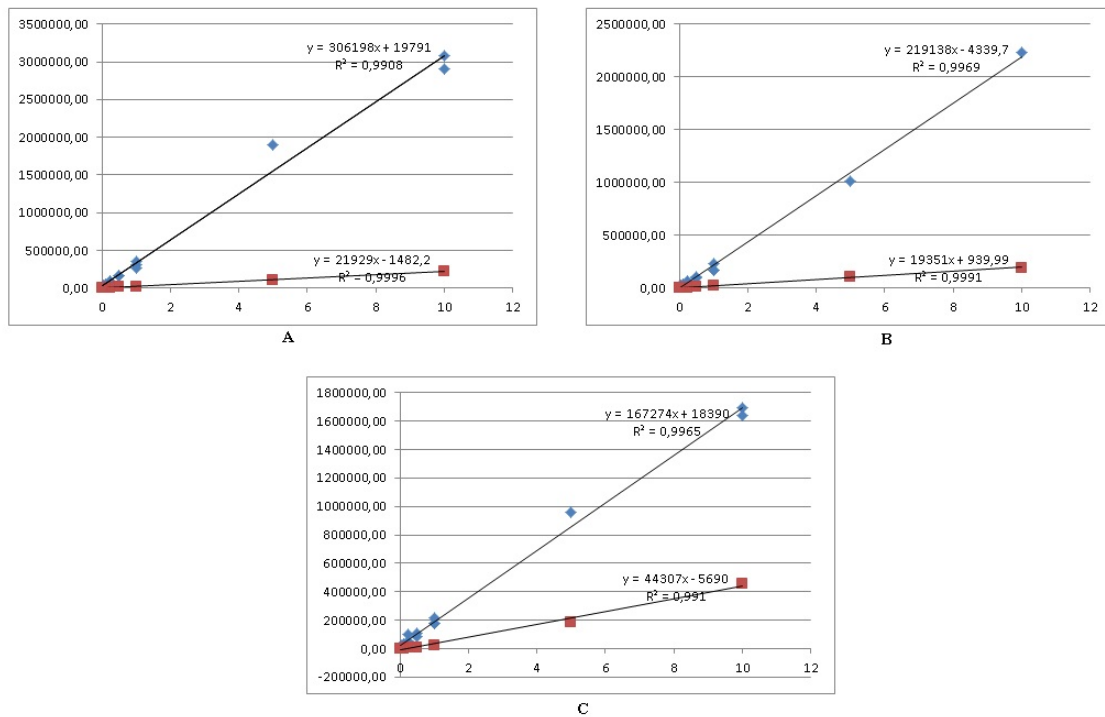


Figura 2: Efecto matriz para cada plaguicida. A. Dimetoato, B. Malatión, C. Deltametrina. En rojo los puntos la solución de plaguicidas en acetato de etilo, en azul los puntos de los plaguicidas en la matriz de aguacate

Tabla 3: Análisis de residuales en matriz de aguacate

Plaguicida	t.Retención [min]	Concentración [mg/L]	Área [Hz*s]	Área promedio	Desviación estándar	Coefficiente Variación
Dimetoato	4.880	0,02	16568.50	16389.78	1098.63	6.70
	4.881	0,02	15814.10			
	4.876	0.02	18048.10			
	4.881	0.02	15081.20			
	4.882	0.02	16437.00			
Malatión	6.512	0.02	26429.70	26742.44	3356.92	12.55
	6.512	0.02	25962.80			
	6.507	0.02	21739.70			
	6.510	0.02	30409.40			
	6.512	0.02	29170.60			
Deltametrina	12.111	0.02	7634.57	8095.09	1185.38	14.64
	12.120	0.02	7946.81			
	12.121	0.02	8126.81			
	12.117	0.02	6768.25			
	12.124	0.02	9999.02			

en las concentraciones superiores.

3.6. Precisión

De los dos niveles de concentración seleccionados: 1mg/kg y 0,25mg/kg, para dimetoato se obtuvieron coeficientes de variación entre las tres repeticiones de 11,28 % y 5,40 % respectivamente, en malatión se lograron coeficientes de variación de 10,16 % y 3,50 % y para deltametrina se alcanzaron valores de 13.18 % y 8.95 %.

3.7. Estimación de incertidumbre

Para el valor estimado más bajo, es decir el límite de cuantificación del método, ($x_o = 0,02mg/kg$), se obtuvieron incertidumbres expandidas de 45,5 %, 21,1 % y 28,1 % para el análisis de residualidad de plaguicidas con dimetoato, malatión y deltametrina respectivamente, cumpliendo con el parámetro de validación $U_g < 50\%$.

4. CONCLUSIONES

El protocolo QuEChERS modificado es efectivo para la detección de los plaguicidas dimetoato, malatión y deltametrina en aguacate Hass.

El método para análisis simultáneo de residuos de los plaguicidas dimetoato, malatión y deltametrina en aguacate Hass, empleando como técnica de cuantificación la cromatografía de gases acoplado a detector de micro-captura de electrones (GC- μ ECD) y siguiendo para la extracción de muestras un protocolo QuEChERS modificado, fue exitosamente validado.

Se cumplieron los criterios de análisis de linealidad de la guía IUPAC 49 (2003), se lograron los requerimientos para límite de cuantificación, porcentaje de recuperación y repetibilidad del documento SANCO 12571 (2013) y se obtuvo una estimación de incertidumbre siguiendo el método *button up* propuesto por IUPAC.

AGRADECIMIENTOS

A CORNARE y al Grupo de Trabajo del Laboratorio de Análisis de Aguas por el apoyo brindado durante la ejecución del trabajo.

Referencias

- Ahumada, D.; Aparicio, L.; Fuentes, J.; Guerrero, J.; Checa, B. (2012), Comparación de dos aproximaciones para la estimación de la incertidumbre en análisis de residuos de plaguicidas mediante cromatografía de gases. *Revista Colombiana de Química*, 41(3), 377-394.
- Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F. J. (2003), Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for determination of pesticide residue in produce. *Journal of AOAC*, 86, 412-431.
- APAEM, A. C. (2013), Plaguicidas recomendados para el cultivo de aguacate. [En Línea]. México. [Consultado en mayo de 2014]. Disponible en: <http://www.apeamac.com/pdf/plag2013.pdf>
- CONPES, 3514 (2008), Política nacional fitosanitaria y de inocuidad para las cadenas de frutas y de otros vegetales. [En Línea]. República de Colombia, Departamento Nacional de Planeación. [Consultado en junio de 2014]. Disponible en: <http://www.ica.gov.co/getattachment/b12bfeda-1f37-4266-9c0c-e5c9e96be7bf/2008CN3514.aspx>
- Ellison, S.; Williams, A. (2012), Quantifying uncertainty in analytical measurement [En Línea]. EURACHEM/CITAC Guide CG 4 [Consultado en Julio de 2014]. Disponible en: http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf
- Fenik, J.; Tankiewicz, M.; Biziuk, M. (2011), Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *Trends Anal. Chem.*, 30, 814–826.
- GPO’s Federal Digital System (2014), Tolerances and exemptions for pesticide chemical residues in food. [En Línea]. USA. [Consultado en mayo de 2014]. Disponible en: <http://www.gpo.gov/fdsys/search/home.action>
- Hunter, R.; Riederer, A.; Ryan, P. (2010), Method for the Determination of Organophosphorus and Pyrethroid Pesticides in Food via Gas Chromatography with Electron-Capture Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 1396–402.
- Ramírez, A.; Gallo, A.; Hoyos, D.; Peñuela, G. (2013), QuEChERS GC-MS validation and monitoring of pesticide residues in different foods in the tomato classification group. *Food Chemistry*, 158, 153–161.
- Ministerio de la Protección Social (2007), Resolución número 2906 de 2007, Por la cual se establecen los Límites Máximos de Residuos de Plaguicidas – LMR en alimentos para consumo humano y en piensos o forrajes. [En Línea]. Colombia. [Consultado en Octubre de 2014]. Disponible en: https://www.invima.gov.co/index.php?option=com_content&view=article&id=583:resolucion-2906-agosto-222007-&catid=106:resoluciones-2007&Itemid=154

Oliveira, A.; Carvalho, D.; Silva, F.; Ferreira, E.; Dutra, E. (2014), Pesticide residues in cashew apple, guava, kaki and peach: GC- μ ECD, GC-FPD and LC-MS/MS multiresidue method validation, analysis and cumulative acute risk assessment. *Food Chemistry*, Accepted Manuscript.

Pesticides Database (2005), Pesticide EU-MRLs Regulation (EC) No 396/2005. [En Línea]. EU. [Consultado en mayo de 2014]. Disponible en: <http://ec.europa.eu/sanco-pesticides/public/?event=homepage>

SANCO, 12571 (2013), Documento de orientación sobre los procedimientos analíticos de control de calidad y validación para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos. [En Línea]. EU. [Consultado en julio de 2014]. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/plant/plant_protection_products/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf

Subsecretaría salud pública (2010), Resolución exenta n^o 33 de 2010-02-16. Fija tolerancias máximas de residuos de plaguicidas en alimentos. [En Línea]. Chile. [Consultado en mayo de 2014]. Disponible en: http://juridico1.minsal.cl/RESOLUCION_33_10.doc

The Japan Food Chemical Research Foundation (2014), Maximum Residue Limits (MRLs) List of Agricultural Chemicals in Foods. [En Línea]. Japón. [Consultado en mayo de 2014]. Disponible en: <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html>

Torrado, A. (2006), Uso de plaguicidas y exigencias del mercado agroalimentario. [En Línea] Memorias II curso internacional de riesgos fitosanitarios para la agricultura colombiana. [Consultado en julio de 2014]. Disponible en: http://www.ica.gov.co/getdoc/d3eecf95-6146-412b-be83-e1e507db9cd6/Articulo_UsodePlaguicidas.aspx

Tuzimski, T. (2014), New Trends in Pesticide Residue Analysis in Various Sample Matrixes. *Journal of AOAC International*, 97(4): guest editor section.

Walorczyk, S. (2014), Validation and use of a QuEChERS-based gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for multi-residue pesticide analysis in blackcurrants including studies of matrix effects and estimation of measurement uncertainty. *Talanta*, 120, 106–113.

Wang, W.; Bostic, T.; Gu, L. (2010), Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chemistry*, 122, 1193–1198.

Yabrudy, J. (2012), El aguacate en Colombia: Estudio de caso de los Montes de María, en el Caribe colombiano. [En Línea]. Documento 171, Banco de la Republica, Colombia. [Consultado en mayo de 2014]. Disponible en: http://www.banrep.gov.co/sites/default/files/publicaciones/archivos/dtser_171.pdf