



# ESCUELA POLITECNICA DEL EJÉRCITO

CARRERA DE INGENIERIA GEOGRAFICA Y  
DEL MEDIO AMBIENTE

PROYECTO DE GRADO PARA  
LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERÍA

DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN  
BANANO (MUSA SAPIENTUM) MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE  
GASES

ADRIANA CAROLINA ZHUNAULA MIER

Sangolquí – Ecuador  
Agosto – 2011

## **DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD**

Yo, Adriana Carolina Zhunaula Mier

### **DECLARO QUE:**

El proyecto de grado titulado “DETERMINACION DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN BANANO (MUSA SAPIENTUM) MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE GASES”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

---

Adriana Carolina Zhunaula Mier

## **C E R T I F I C A C I Ó N**

Nosotros: ING. OLIVA ATIAGA e ING. PAULINA GUEVARA

### **CERTIFICAN**

Que, el Proyecto de grado titulado “DETERMINACION DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN BANANO (MUSA SAPIENTUM) MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE GASES”, realizado por la señorita ADRIANA CAROLINA ZHUNAULA MIER ha sido revisado prolijamente y cumple con los requerimientos: teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la ESPE.

---

Ing. Oliva Atiaga  
DIRECTOR

---

Ing. Paulina Guevara  
CODIRECTOR

## RESUMEN

La Tesis: **“Análisis de Pesticidas Organofosforados en Banano (*Musa Sapientum*) mediante Cromatografía de Gases”**, se lleva a cabo en el laboratorio de Medio Ambiente del Departamento de Ciencias de la Tierra y la Construcción de la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE), Campus Sangolquí.

El banano es un alimento fresco, de poder vitamínico y nutricional, que contiene elementos esenciales en una dieta balanceada, sin embargo, a pesar de sus bondades nutricionales, la población general podría verse expuesta a la presencia de residuos de plaguicidas en el producto fresco como consecuencia de los tratamientos fitosanitarios, éstos pueden provocar diversos efectos tóxicos en distintos sistemas biológicos, constituyendo un daño potencial tanto para la población humana como para el medio ambiente en general.

En este sentido, ante la necesidad del Laboratorio de Medio Ambiente de tener un procedimiento validado y considerando que hay pocos laboratorios acreditados que realizan análisis para la determinación de la residualidad de pesticidas organofosforados en el banano (*Musa Sapientum*), desarrolla un método validado que permite determinar si este cumple con los límites establecidos para su consumo de acuerdo al Codex Alimentarius.

Para la determinación de los pesticidas se uso extracción en fase sólido - líquido y cromatografía de gases con detector Nitrógeno Fosforo (NPD) cuyos resultados serán analizados estadísticamente.

## **SUMMARY**

Thesis: "**Analysis of organophosphate pesticides in banana (*Musa Sapientum*) by Gas Chromatography**", is performed in the laboratory of Environmental Sciences Department of Earth and the Construction of the Army Polytechnic School (ESPE) Campus Sangolquí.

Banana is a fresh food, vitamin and nutritional power, which contains essential elements in a balanced diet, however, despite its nutritional benefits, the general population may be exposed to the presence of pesticide residues in fresh produce as result of pesticide treatments, they can cause various toxic effects in different biological systems, thus constituting a potential danger for humans and the environment in general.

In this regard, given the need for Environmental Laboratory have a validated procedure and considering that there are few accredited laboratories carrying out analysis for the determination of residual organophosphorus pesticides in banana (*Musa Sapientum*), develops a validated method that allows determine whether it complies with the limits for consumption according to Codex Alimentarius.

For the determination of pesticides using solid - liquid phase extraction and gas chromatography with nitrogen phosphorus detector (NPD), whose results will be analyzed statistically.

## **DEDICATORIA**

Dedicada a Dios y a mí Morenita por guiar e iluminar mi camino.

Dedicada a esta lucha constante de gratas vivencias y de momentos de superación.

Dedicada a mis padres quienes con su amor incondicional han estado junto a mí en cada decepción, cada caída, cada puesta en pie, con cada regaño, con cada "te lo dije", con cada lágrima, con el abrazo y una sonrisa entrañable.

A mi hermana que ha compartido secretos y aventuras que ha estado siempre alerta ante cualquier problema, demostrando un amor inigualable.

## **AGRADECIMIENTO**

Muchas han sido las personas que de manera directa o indirecta me han ayudado en la realización de esta tesis. Quiero dejar constancia de todas ellas y agradecerles con sinceridad su participación

En primer lugar, Ing. Oliva Atiaga y Paulina Guevara porque fueron ellas quienes durante este arduo trabajo teórico práctico estuvieron al tanto del mismo, gracias por su tiempo invertido, por su cordialidad y su apoyo incondicional, gracias por sus palabras de ánimo, por todos sus sabios consejos, por la buena disposición y por las respuestas a mis múltiples necesidades técnicas.

A mi grande familia, todos dignos de ejemplo de trabajo y constancia, quienes me han brindado el apoyo necesario para alcanzar mis metas y sueños, y han estado allí cada día, compartiendo los buenos y malos momentos desde el primer minuto de mi vida.

A Diego que llegó en el momento adecuado a mi vida, gracias por el apoyo absoluto, por ayudarme a escoger el camino, por tus palabras, tu comprensión, siempre me alentaste a seguir adelante incluso con mis buenas y malas ideas, gracias por todas las decisiones tomadas.

## PROLOGO

El sector agropecuario en Ecuador, tiene enorme importancia económica y social.

Su importancia económica es innegable, a más de ser la actividad económica que más aporta al PIB Total, es la segunda actividad generadora de divisas. Su importancia social es evidente también, ya que genera empleo para alrededor de 1'000.000 de hombres y mujeres, cantidad equivalente al 23,1% de la población económicamente activa total.

Pero mientras el desarrollo agropecuario surge económicamente, la realidad es otra, millones de personas en el mundo mueren de hambre y según el CIATOX, Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico del Ministerio de Salud Pública en Ecuador, ha asesorado un total de 374 casos, lo que significa un promedio de 65 casos mensuales en materia de Intoxicaciones en el primer semestre del año 2009, causados por sustancias químicas diversas y complejas, de las cuales, las intoxicaciones con plaguicidas constituyen una de las infecciones con mayor demanda debido a la prevalencia de zonas agrícolas en el país y su importancia en el desarrollo de la actividad económica nacional.

Existen numerosos estudios científicos en los que se muestran los problemas que provocan este tipo de sustancias en el organismo, un ejemplo sería el estudio que realizó el año pasado la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria). En él se mostraba que de un total de 236 de estas sustancias, más de la mitad (144) ofrecían riesgos potenciales para la salud humana provocando, entre otros problemas, cáncer. [3]



Environmental Working Group (EWG) encontró en sus estudios que: En las provisiones alimenticias de los Estados Unidos el 13% de las manzanas, el 7% de las peras y el 5% de las uvas, expone al niño promedio a comer estas frutas en niveles inseguros de insecticidas organofosforados. También se encontró que todos los días, 9 de cada 10 niños americanos, entre seis meses y cinco años, son expuestos a combinaciones de 13 insecticidas neurotóxicos diferentes en los alimentos que consumen (EWG, 1993, 1998). [4]

Los objetivos generales del monitoreo de la contaminación alimenticia son: Proteger la salud, mejorar el manejo de recursos agrícolas y de alimentos, identificar combinaciones de plaguicidas particulares, que frecuentemente están en los productos y prevenir pérdidas económicas.

En nuestro país el diagnóstico, la vigilancia y el monitoreo de plaguicidas en alimentos aún no se ha implementado de forma eficaz, y existe una tendencia fuerte de los agricultores a usar plaguicidas en forma excesiva en producciones de: flores, palma africana, banano, palmito y últimamente productos no tradicionales como tomate, espárragos, brócoli, naranjilla, babaco, etc., debido especialmente a motivaciones económicas. Por tal razón dentro de las políticas que deberían ser reguladas en Ecuador se encuentra colocada la necesidad de disminuir el consumo y aplicación de plaguicidas en la producción agrícola.

Una cosa es evidente, se ha abusado excesivamente de fertilizantes, fungicidas, plaguicidas o pesticidas, todo por asegurar las cosechas, pero no se ha tenido en cuenta el asegurar la alimentación y sobre todo la salud, por eso nos encontramos que en cualquier lugar y en cualquier eslabón de la cadena alimentaria, estos productos están presentes.

Por lo expuesto, es necesario desarrollar métodos para el análisis químico de pesticidas en alimentos, considerando que hay pocos laboratorios acreditados que realizan estos análisis.

# INDICE GENERAL

---

	<b>Página</b>
Certificación	
Resumen	
Summary	
Dedicatoria	
Agradecimiento	
Prólogo	
<b>I. GENERALIDADES</b>	
1.1. Antecedentes	1
1.2. Definición del problema	3
1.3. Descripción del área de estudio	3
1.4. Objetivos	3
1.4.1. Objetivo general	3
1.4.2. Objetivos específicos	3
1.5. Metas	4
<b>II. MARCO TEORICO</b>	
2.1. El Cultivo del banano	5
2.1.1. El banano en el Ecuador	6
2.1.2. Pesticidas del banano	6
2.2. Normativa	7
2.3. Generalidades sobre los pesticidas	9
2.3.1. Concepto de pesticidas	9
2.4. Clasificación de los pesticidas	10
2.4.1. Origen	10
2.4.2. Toxicidad	10
2.4.3. Naturaleza química	11
2.4.4. Según el tipo de organismo que desea controlar	11
2.5. Pesticidas representativos	11
2.5.1. Pesticidas organoclorados	11
2.5.2. Pesticidas organofosforados	14
2.5.3. Pesticidas carbamatos	17

2.5.4. Pesticidas en estudio	19
2.6. Métodos empleados en la determinación de pesticidas en alimentos	23
2.6.1. Muestreo y preservación de la muestra	23
2.6.2. Métodos de extracción de pesticidas	24
2.7. Separación, identificación y cuantificación de pesticidas	30
2.7.1. Cromatografía de gases	30
2.8. Validación	45
2.8.1. Importancia de validar un método	46
2.8.2. Aplicación	46
2.8.3. Parámetros	47
2.8.4. Distribuciones de probabilidad	57
2.8.5. Distribución T de Student	60
2.8.6. Grados de libertad	60

### **III. PROCEDIMIENTO**

3.1. Aplicación	61
3.2. Parámetros a determinar	62
3.3. Muestras	62
3.3.1. Selección de la muestra o muestreo	62
3.4. Interferencias en el método	62
3.4.1. Interferencias	62
3.4.2. Condiciones de trabajo	63
3.5. Equipos de laboratorio	63
3.6. Materiales	67
3.7. Reactivos y estándares	67
3.7.1. Reactivos	67
3.7.2. Estándares	67
3.8. Soluciones	68
3.9. Protocolo de análisis	70
3.9.1. Recolección de la muestra	70
3.9.2. Preparación de la muestra	70
3.9.3. Proceso de extracción	71
3.9.4. Proceso de limpieza o clean - up	74

3.9.5. Proceso de concentrado	75
3.9.6. Almacenamiento	76
3.9.7. Cuantificación mediante cromatografía gaseosa	77
3.10. Cálculos	78
3.11. Validación del método analítico	79
3.12. Esquema del proceso	80
<b>IV. DATOS EXPERIMENTALES</b>	
4.1. Blancos	81
4.2. Estándares	85
4.3. Muestra de validación	89
<b>V. CALCULOS Y RESULTADOS</b>	
5.1. Curva de calibración del equipo	93
5.2. Cálculo de concentración de la muestra de validación	98
5.3. Parámetros de validación a determinar	103
5.3.1. Límite de detección	103
5.3.2. Límite de cuantificación	105
5.3.3. Precisión (repetibilidad y/o reproducibilidad)	105
5.3.4. Determinación de la incertidumbre del método	110
5.3.5. Exactitud – porcentaje de recuperación	118
5.3.6. Intervalo de trabajo	119
<b>VI. DISCUSION DE RESULTADOS</b>	121
<b>VII. COCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	
7.1. Conclusiones	123
7.2. Recomendaciones	125
<b>VIII. ANEXOS</b>	
Anexo A1: Cromatogramas	127
Anexo A2: Procedimiento Técnico	128
Anexo A3: Instructivo de uso y manejo del cromatógrafo de gases	148
Anexo A4: Instructivo de material de vidrio	165
Anexo A5: Hojas de validación	173

## INDICE DE TABLAS

---

	<b>Página</b>
Tabla 2.1 Áreas de banano inscritas en el Ecuador	6
Tabla 2.2 Lista de pesticidas usados en el banano en Ecuador y clase toxicológica	7
Tabla. 2.3. Límites máximos residuales de pesticidas	8
Tabla 2.4 Clasificación de los pesticidas según su toxicidad	10
Tabla 2.5 Tamaño mínimo de recolección de la muestra de banano	24
Tabla 2.6 Técnicas de extracción de pesticidas	25
Tabla 2.7 Fase móvil y estacionaria en diferentes técnicas cromatográficas	40
Tabla 2.8 Tabla para el análisis simple de la varianza	55
Tabla 2.9 Análisis de varianza, ANOVA	56
Tabla 3.1 Pesticidas organofosforados seleccionados para el análisis	62
Tabla 3.2 Mix de pesticidas organofosforados, Concentración e Incertidumbre	68
Tabla 3.3 Condiciones cromatográficas establecidas para pesticidas organofosforados	77
Tabla 4.1 Datos de tiempo, altura y área del Blanco, día 1	81
Tabla 4.2 Datos de tiempo, altura y área del Blanco, día 2	82
Tabla 4.3 Datos de tiempo, altura y área del Blanco, día 3	83
Tabla 4.4 Datos de tiempo, altura y área del Estándar de 0,6 ppm	85
Tabla 4.5 Datos de tiempo, altura y área del Estándar de 1 ppm	86
Tabla 4.6 Datos de tiempo, altura y área del Estándar de 10 ppm	87
Tabla 4.7 Datos de tiempo, altura y área del Estándar de 14 ppm	88
Tabla 4.8 Datos de tiempo, altura y área del Extracto de 1 ppm, día 1	89
Tabla 4.9 Datos de tiempo, altura y área del Extracto de 1 ppm, día 2	90
Tabla 4.10 Datos de tiempo, altura y área del Extracto de 1 ppm, día3	91
Tabla 5.1 Promedio de áreas de estándares para la curva de calibración	94
Tabla 5.2 Promedio de áreas de blancos	94

Tabla 5.3 Concentración por analito del extracto de 1 ppm	99
Tabla 5.4 Concentración por analito de extracto blancos	100
Tabla 5.5 Concentración por analito de la muestra de 0,03 ppm	101
Tabla 5.6 Concentración por analito de la muestra del blanco	102
Tabla 5.7 Límite de detección y cuantificación por analito	105
Tabla 5.8 Análisis para la muestra de 0,03 ppm analito DDVP	107
Tabla 5.9 Resultados ANOVA de la muestra de 0,03 ppm por analito	108
Tabla 5.10 Análisis de organofosforados totales	110
Tabla 5.11 Resultados de precisión (repetibilidad, reproducibilidad y coeficiente de variación)	110
Tabla 5.12 Incertidumbre del Material	112
Tabla 5.13 Concentraciones del mix de pesticidas organofosforados	113
Tabla 5.14 Incertidumbre de soluciones del analito DDVP	114
Tabla 5.15 Incertidumbre de soluciones del analito Phosdrin y Chlorpyrifos	114
Tabla 5.16 Incertidumbre de soluciones del analito Ethoprophos	114
Tabla 5.17 Incertidumbre de soluciones del analito Stirofos	115
Tabla 5.18 Incertidumbre de soluciones del analito Parathion y Disulfoton Sulfon	115
Tabla 5.19 Incertidumbre de precisión	116
Tabla 5.20 Incertidumbre de trazabilidad	117
Tabla 5.21 Incertidumbres por analito	118
Tabla 5.22 Promedios de la concentración de la muestra de 0,03 ppm	118
Tabla 5.23 Porcentajes de recuperación	119
Tabla 5.24 Porcentajes de recuperación, estándar de control en el proceso de preparación de la muestra	119
Tabla 5.25 Porcentajes de recuperación, estándar de control en el proceso de filtración de la muestra	119
Tabla 5.26 Porcentajes de recuperación, estándar de control en el proceso de evaporación de la muestra	119

Tabla 5.27 Porcentajes de recuperación, usando solvente Tolueno	119
Tabla 5.28 Intervalo de Trabajo	120

## INDICE DE FIGURAS

---

	<b>Página</b>
Figura 2.1 Esquema de un cromatógrafo de gases	31
Figura 2.2 Sistema de inyección	32
Figura 2.3 Insertos	33
Figura 2.4 Inyección con división de flujo	34
Figura 2.5 Divisor de flujo cerrado	35
Figura 2.6 Divisor de flujo abierto	36
Figura 2.7 Enfoque con solvente	37
Figura 2.8 Esquema del detector nitrógeno fosforo	43
Figura 2.9 Cromatograma	45
Figura 3.1 Cromatógrafo de gases, ordenador	64
Figura 3.2 Rotavapor Buchi R-210	64
Figura 3.3 Balanza analítica	65
Figura 3.4 Centrifuga HETTICH	65
Figura 3.5 Estufa	66
Figura 3.6 Licuadora Oster	66
Figura 3.7 Homogenización y pesaje de la muestra	71
Figura 3.8 Adición del estándar de control	72
Figura 3.9 Adición de solventes	73
Figura 3.10 Centrifugación	73
Figura 3.11 a) Extracto sin filtración b) extracto filtrado	74
Figura 3.12 Concentrado	75
Figura 3.13 Extracto final	75
Figura 3.14 Cromatograma organofosforados	78
Figura 5.1 Grafica de la ecuación lineal para el analito DDVP	95
Figura 5.2 Grafica de la ecuación lineal para el analito Phosdrin	95
Figura 5.3 Grafica de la ecuación lineal para el analito Ethoprophos	96



Figura 5.4 Grafica de la ecuación lineal para el analito Parathion	96
Figura 5.5 Grafica de la ecuación lineal para el analito Chlopyrifos	97
Figura 5.6 Grafica de la ecuación lineal para el analito Stirofos	97
Figura 5.7 Grafica de la ecuación lineal para el analito Disulfoton Sulfon	98

## INDICE DE HOJAS TECNICAS

---

	<b>Página</b>
Cromatogramas	124
Procedimiento técnico	125
Instructivo de uso y manejo del cromatógrafo de gases	145
Instructivo de material de vidrio	162
Hojas de validación	170

## GLOSARIO

---

### Abreviaturas

<b>°C</b>	Grados Centígrados
<b>CV</b>	Coeficiente De Variación
<b>%DSR</b>	Desviación estándar relativa
<b>FAO</b>	Organización De Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentación
<b>gr.</b>	Gramos
<b>GC</b>	Cromatografía De Gases
<b>h.</b>	Hora
<b>JL.</b>	Jéfe de Laboratorio
<b>Kg.</b>	Kilogramo
<b>LoD</b>	Límite De Detección
<b>LoC</b>	Límite De Cuantificación
<b>LMA</b>	Laboratorio de Medio Ambiente
<b>LMR</b>	Límite Máximo De Residuos
<b>mL.</b>	Mililitro
<b>min.</b>	Minuto
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>NPD</b>	Detector Nitrógeno Fósforo
<b>OF</b>	Organofosforados
<b>ppm</b>	Partes Por Millón (mg/mL) (mg/Kg)(ng/μL), unidad de concentración
<b>rpm</b>	Revoluciones Por Minuto
<b>TCNAV</b>	TotalChrom Navigator
<b>μg</b>	Microgramo
<b>μL.</b>	Microlitro

## **Definiciones:**

**Cromatografía:** Técnica que separa una mezcla de solutos basada en la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos que se establece al ser arrastrados por una fase móvil (líquida o gaseosa) a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria, la cual puede ser sólida o líquida.

**Plaguicida:** Los plaguicidas son sustancias químicas utilizadas para controlar, prevenir o destruir las plagas que afectan a las plantaciones agrícolas.

**Plaga:** Aquellos organismos nocivos que transmiten enfermedades, compiten por alimentos y/o dañan bienes económicos y culturales.

**Disolvente Grado Plaguicida:** Un disolvente orgánico se considera grado plaguicida o nanogrado, si el cromatograma obtenido en un cromatógrafo gas - líquido con detector de captura de electrones, al concentrarse cien veces no presenta picos.

**Organofosforado:** sustancias orgánicas de síntesis, conformadas por un átomo de fósforo unido a 4 átomos de oxígeno o en algunas sustancias a 3 de oxígeno y uno de azufre.

**Solvente:** compuestos orgánicos basados en el elemento químico Carbono. Estas sustancias que expelen vapores a temperatura ambiente (solventes volátiles como la acetona) o que son en sí mismas gases pueden ser inhalados a través de la boca o nariz.

**Límite Máximo de Residuos:** concentración máxima del residuo de un plaguicida autorizada en o sobre alimentos.

**Gas Portador o Carrier:** Inerte, generalmente helio, nitrógeno o argón, de elevado grado de pureza.

**Sistema de Inyección:** Lugar por donde se introduce una pequeña cantidad de muestra (del orden de 1 cm<sup>3</sup> de gas o 1 µL de líquido) en medio de la corriente de gas "carrier".

**Sistema de Separación:** Formado por una o varias columnas que llevan a cabo la tarea de fraccionamiento de los diferentes componentes.

**Sistema de Detección:** Para generar una señal cuando un componente de la mezcla completa el recorrido del sistema de separación.

**Sistema de Integración:** Para cuantificar la señal generada por cada componente en el detector.

**Columnas** pueden ser con relleno, en las que la fase estacionaria líquida está retenida sobre un sólido inerte (soporte) y capilares ó semi-capilares, en las que la fase estacionaria se fija sobre las paredes interiores del capilar. La temperatura de la columna depende de los puntos de ebullición de los componentes de la mezcla.

**Detector:** tiene por objeto medir la variación de alguna propiedad física del gas portador originada por la elución de los compuestos. La temperatura del detector ha de ser mayor o igual que la de columna para evitar la condensación de algún compuesto eluido.

#### **Función respuesta / linealidad [C-CSQ-01 Rev. 1, 15.8:94]**

Es la relación entre la concentración de analito y la respuesta del método. Esta relación, denominada comúnmente curva patrón o curva de calibración, no tiene por

qué ser lineal para que el método sea eficaz. Cuando no sea posible la linealidad para un método, se deberá encontrar un algoritmo adecuado.

**Límite de cuantificación (del método)** [C-CSQ-01 Rev. 1, 15.11:94]

Concentración mínima de analito que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión. Se establece utilizando una muestra o material de referencia apropiado. Normalmente corresponde al punto inferior de la curva de calibración (excluido el blanco). No debe determinarse por extrapolación.

**Límite de detección (del método)**

Mínima concentración de analito que se puede detectar siguiendo el proceso completo del método con un nivel aceptable de confianza de que dicha concentración es mayor que el blanco.

**Recuperación**

Procedimiento que establece el sesgo (o desviación del valor real) de un método de ensayo (lo que nos permite corregir los resultados obtenidos o modificar el método con el fin de mejorar el sesgo).

**Repetibilidad** [ISO 5725-1, 3.13, 3.14:94] [ISO 3534-1, 3.15, 3.16:93]

Precisión bajo condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, con el mismo operador, utilizando el mismo instrumento de medida y durante un corto intervalo de tiempo.

# CAPITULO I

## GENERALIDADES

### 1.1 Antecedentes

El empleo de plaguicidas o pesticidas en la agricultura está muy extendido, pues se los considera esenciales para lograr mejores condiciones de cultivo. Sin embargo la lista de sustancias utilizadas en esta actividad incluye algunas peligrosas que han afectado al medio ambiente y a la salud humana a través de la ingesta diaria admisible IDA.

Los plaguicidas o pesticidas son resultado del antiguo anhelo del ser humano por librarse de las plagas que invaden su modo de vida. Pero en el mundo moderno ya es conocida la otra cara de algunas de estas sustancias: son venenos peligrosos para la salud y el ambiente.<sup>1</sup>

Su uso se masificó a partir de la segunda guerra mundial. El primer plaguicida utilizado en los '40, el DDT, fue presentado al mundo como la solución para todas las plagas sin efectos negativos para el hombre, e hizo a su descubridor merecedor del Premio Nobel. Los primeros organofosforados fueron sintetizados en los '50 y actualmente se usan a grandes escalas.

Teniendo en cuenta los alarmantes descubrimientos de los riesgos ambientales del uso de plaguicidas, en los años 60's surgió el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos. Desde ese momento a nivel mundial se han

---

1. Plaguicidas pesticidas, <http://www.tierramerica.net/2002/1201/conectate.shtml>, 2002.

implementado programas de vigilancia y monitoreo de niveles residuales de plaguicidas en alimentos.<sup>2</sup>

En noviembre de 2002 el Consejo de la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) aprobó una versión revisada del “Código de Conducta sobre la Distribución y el Uso de Pesticidas”, en el cual se plantea la responsabilidad de los gobiernos en la regulación de estas sustancias, la necesidad de ayudar a los países con dificultades técnicas para asumir los riesgos de su utilización, y la importancia de contar con buenas prácticas de producción y comercio.

Aunque el uso de plaguicidas ha generado beneficios concretos en la producción agrícola, el empleo inadecuado de los mismos ha producido diferentes formas de contaminación ambiental que afectan al suelo, agua, aire y a los productos agrícolas por la acumulación de residuos.

La Escuela Politécnica del Ejército, ESPE conjuntamente con el Departamento de Ciencias de la Tierra y la Construcción a través del Laboratorio de Medio Ambiente (LMA) han incursionado en proyectos de Investigación Científica y Extensión, los cuales se encuentran comprometidos a proteger el medioambiente, dicho laboratorio, ante la necesidad de disponer de procedimientos confiables de análisis de pesticidas en matrices sólidas como los alimentos en el LMA, cuya finalidad en este trabajo de investigación, es colaborar con la comunidad afectada por el uso de estos compuestos tóxicos.

## **1.2 Definición del problema**

El Laboratorio de Medio Ambiente, LMA, ante la necesidad de tener un procedimiento validado de análisis para la determinación de pesticidas en matrices sólidas como el banano (*musa sapientum*), un área de estudio poco investigada en nuestro país, pretende desarrollar un método que permita

---

2. Murcia, A., Stashenko, E. (2008) Determinación de Plaguicidas Organofosforados en vegetales producidos en Colombia, Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias CIBIMOL, Laboratorio de Cromatografía, Bucaramanga. Colombia, Pág. 4.



determinar si el alimento en estudio cumple con los límites establecidos para su consumo.

Cabe destacar que el Laboratorio de Medio Ambiente desde el año 2009 está en proceso de acreditación, su desempeño se ha basado en el impulso de procedimientos de parámetros ambientales de compuestos dañinos a la salud para el apoyo a la comunidad que podría estar afectada.

El proyecto será desarrollado bajo la metodología generada por la Agencia de Protección Ambiental, EPA, de los Estados Unidos y bajo los códigos de alimentación establecidos por la FAO (*CODEX ALIMENTARIUS*).

### **1.3 Descripción del área de estudio**

El área de influencia directa corresponde a la comunidad afectada por el uso excesivo de pesticidas en alimentos.

### **1.4 Objetivos**

#### **1.4.1 Objetivo general**

- Determinar en el banano residuos de pesticidas órgano fosforados, empleando la cromatografía de gases.

#### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Desarrollar el método de extracción de pesticidas en el banano empleando solventes orgánicos puros y en mezcla.
- Establecer las condiciones de operación del equipo de cromatografía de gases para determinar pesticidas organofosforados.
  
- Validar el procedimiento y estimar el cálculo de la incertidumbre del procedimiento de determinación de pesticidas órgano fosforados en el banano.

#### **1.5 Metas**

- Documentar los procedimientos técnicos internos del LMA para los análisis realizados en pesticidas fosforados en el banano mediante la técnica de cromatografía de gases de acuerdo a los formatos del manual de calidad del LMA.
  
- Elaborar los reportes y la declaración de los métodos técnicos de validación, de acuerdo a los formatos del manual de calidad del LMA.
  
- Aplicar la hoja de cálculo del LMA para el cálculo de la incertidumbre y los parámetros de validación.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. El cultivo del banano**

El banano es una fruta originaria del sur del Asia. A partir de 1940, comenzó a cultivarse a gran escala en nuestro país y con el tiempo su exportación se convirtió en la principal fuente generadora de divisas para el estado ecuatoriano.

En la década de los años 50 se dio el boom bananero convirtiéndose el Ecuador en el primer exportador mundial de la fruta. Actualmente el banano constituye el segundo rubro de exportación de nuestro país.

Para su producción el Ecuador cuenta con las condiciones climáticas adecuadas para el cultivo de esta fruta tomando en cuenta la luz solar, terrenos irrigados, clima caliente y húmedo. Alcanza una altura entre 3,50 y 4 metros de acuerdo a la densidad de la plantación, el racimo posee entre 7 y 10 manos con un número de frutos que fluctúan entre 11 y 13.<sup>3</sup>

Los frutos tienen forma curvada y la pulpa madura tiene un color crema y sabor dulce, contiene un 75% de agua y un 22% de carbohidratos, principalmente azúcar, minerales, vitaminas, grasas y proteínas. Es un producto de alto valor nutritivo y lo consumen niños, adultos y ancianos.

---

<sup>3</sup> Núñez, R., El Cultivo del Banano, Programa Nacional del Banano, Ministerio de Agricultura y Ganadería.

### 2.1.1. El banano en el Ecuador

Según datos oficiales del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, tomado en agosto 31 del 2009, las áreas sembradas **inscritas** en El Oro, Guayas y Los Ríos, las principales del país y de otras provincias en dicha dependencia, ascienden a 170.897 hectáreas, las mismas que se desglosan en la Tabla 2.1.

Tabla. 2.1. Áreas de banano inscritas en el Ecuador

EL ORO (HAS)	GUAYAS (HAS)	LOS RIOS (HAS)	OTRAS (HAS)	TOTAL (HAS)
49.129,50	50.719,04	56.045,98	15.002,02	170.896,54

Fuente: Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador

### 2.1.2. Pesticidas del banano:

El uso de cantidades considerables de plaguicidas en el cultivo de banano para controlar enfermedades puede provocar presencia de residuos de compuestos organofosforados, lo cual constituye un riesgo toxicológico para los consumidores, así como una posible pérdida de mercado y de oportunidades comerciales.

Hasta el momento, el principal y casi único control es el químico y se utilizan fungicidas de contacto y sistémicos para destruir los hongos y nemátodos que atacan a la planta.

En la siguiente Tabla 2.2. se muestra el tipo de pesticidas que se usan para el control de plagas del Banano en los que se encuentran los dos plaguicidas en estudio Ethopropos y Clorpirifos.

**Tabla. 2.2. Lista de pesticidas usados en el banano en Ecuador y clase toxicológica**

<b>PLAGUICIDA NOMBRE COMERCIAL</b>	<b>PLAGUICIDA NOMBRE COMUN</b>	<b>TOXICOLOGIA</b>
Ranger	Glifosato	Altamente Peligroso
Calixin	Tridemorf	Altamente Peligroso
Tilt, Bumper	Propiconazole	Moderadamente Peligroso
Gramaxone	Paraquat	Extremadamente Peligros
Triziman, Dithane	Mancozeb	Levemente Peligroso
Benlate	Benomyl	Levemente Peligroso
Sico	Difenoconazole	Moderadamente Peligroso
Basudin	Diazinon	Moderadamente Peligroso
Baycor	Bitertanol	Moderadamente Peligroso
Bankit	Azoxystrobin	Levemente Peligroso
Mertect	Thiabendazole	Moderadamente Peligroso
Imazalil	Imazalil	Altamente Peligroso
Dursban	Chlorpiryfos	Altamente Peligroso
Furadan	Carbofuran	Extremadamente Peligroso
Vydate	Oxamyl	Extremadamente Peligroso
Indar	Fenbucozanole	Moderadamente Peligroso
Mocap	Ethoprophos	Extremadamente Peligroso
Roundup Original	Glifosato-isopropilamonio	Altamente Peligroso
Counter	Terbufos	Extremadamente Peligroso

Fuente: Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador

## **2.2. Normativa**

Debido a que el Ecuador no posee normativas que regulen los residuos de pesticidas en alimentos se ha considerado como referencia la Norma de La Comisión del Código de Alimentos o Codex Alimentarius, la misma que fue creada en 1963 por la FAO y la OMS para desarrollar normas alimentarias, reglamentos y otros textos relacionados.

Su principal función es la protección de la salud de los consumidores, asegurar prácticas de comercio claras y promocionar la coordinación de todas las normas alimentarias.

En la Tabla 2.3. se indica los límites permisibles de pesticidas en el banano establecidos en el Codex Alimentarius, en esta se encuentran los plaguicidas en estudio mencionados anteriormente, los mismos que forman parte del Mix de Pesticidas Organofosforados que usado para el desarrollo de este proyecto.

**Tabla. 2.3. Límites máximos residuales de pesticidas**

<b>Banano</b>		
<b><i>Plaguicida</i></b>	<b><i>Valor</i></b>	
Bitertanol	<i>LMR (mg/kg)</i>	0.5
Boscalid	<i>LMR (mg/kg)</i>	0.2
Cadusafos	<i>LMR (mg/kg)</i>	0.01
Carbendazim	<i>LMR (mg/kg)</i>	0.2
Carbofuran	<i>LMR (undef)</i>	0.1
Clorotalonilo	<i>LMR (mg/kg)</i>	0.01
Clorpirifos	<i>LMR (undef)</i>	2
Difenoconazol	<i>LMR (mg/kg)</i>	0.1
Ditiocarbamatos	<i>LMR (undef)</i>	2
Etoprofos	<i>LMR (undef)</i>	0.02
Fenamifos	<i>LMR (mg/kg)</i>	0.05
Fenarimol	<i>LMR (mg/kg)</i>	0.2
Fenbuconazol	<i>LMR (mg/kg)</i>	0.05
Fenbutatin Óxido	<i>LMR (mg/kg)</i>	10
Fenpropimorf	<i>LMR (undef)</i>	2
Fipronil	<i>LMR (mg/kg)</i>	0.005
Flusilazol	<i>LMR (mg/kg)</i>	0.03
Glifosato	<i>LMR (undef)</i>	0.05
Glufosinato-Amonio	<i>LMR (mg/kg)</i>	0.2

Haloxifop	<i>LMR (mg/kg)</i>	0.05
Imazalil	<i>LMR (mg/kg)</i>	2
Imidacloprid	<i>LMR (mg/kg)</i>	0.05
Miclobutanilo	<i>LMR (mg/kg)</i>	2
Piraclostrobin	<i>LMR (undef)</i>	0.02
Pirimetanil	<i>LMR (mg/kg)</i>	0.1
Propiconazol	<i>LMR (undef)</i>	0.1
Tebuconazol	<i>LMR (mg/kg)</i>	0.05
Terbufos	<i>LMR (undef)</i>	0.05
Tiabendazol	<i>LMR (mg/kg)</i>	5
Triadimenol	<i>LMR (undef)</i>	0.2
Trifloxistrobin	<i>LMR (undef)</i>	0.05

Fuente: Codex Alimentarius

## **2.3. Generalidades sobre los pesticidas**

### **2.3.1. Concepto de pesticidas**

El concepto de pesticidas o plaguicidas, puede entenderse como sinónimos, ya que su única diferencia es una traducción incorrecta de la palabra del idioma inglés al español, *pesticide* pesticida. Ambos términos provienen de la palabra plaga.

Una definición detallada y completa ofrece la FAO y la Organización Mundial de la Salud pues definen como plaguicida “cualquier sustancia o mezcla de sustancias, de carácter orgánico o inorgánico, que está destinada a combatir cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que son perjudiciales para el hombre o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte, comercialización o producción de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, también aquellos que pueden administrarse a los animales para combatir insectos arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos.

Se incluye también los siguientes tipos de sustancias:

- Reguladoras del crecimiento de las plantas
- Defoliantes
- Desecantes
- Agentes para reducir la densidad de la fruta
- Agentes para evitar la caída prematura de la fruta”<sup>4</sup>

## 2.4. Clasificación de los pesticidas

Los plaguicidas se pueden clasificar en función de diferentes factores:

### 2.4.1. Origen

- Natural
- Sintético

### 2.4.2. Toxicidad

Se realiza basado en la dosis a la cual se presenta mortalidad. (Tabla 2.4)

Tabla. 2. 4. Clasificación de los pesticidas según su toxicidad

CATEGORIA	DEFINICION	DOSIS LETAL 50 (ORAL AGUDA EN RATAS)
I	Extremadamente tóxicos	0 - 5 mg/Kg
II	Altamente tóxicos	5 - 50 mg/Kg
III	Medianamente tóxicos	50 - 500 mg/Kg
IV	Ligeramente tóxicos	Mayor de 500 mg/Kg

Fuente: Clasificación y Toxicidad de los plaguicidas

---

4 Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO, Departamento de Agricultura, Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas (Versión Revisada), Art. N° 2 “Términos y Definiciones”, Noviembre 2002.. Pág. 11.



### **2.4.3. Naturaleza química**

- Organoclorados
- Organofosforados
- Carbamatos
- Piretroides
- Organomercuriales
- Quinonas
- Anilinas
- Bencimidazoles
- Triazinas
- Entre otros.

### **2.4.4. Según el tipo de organismo que desea controlar**

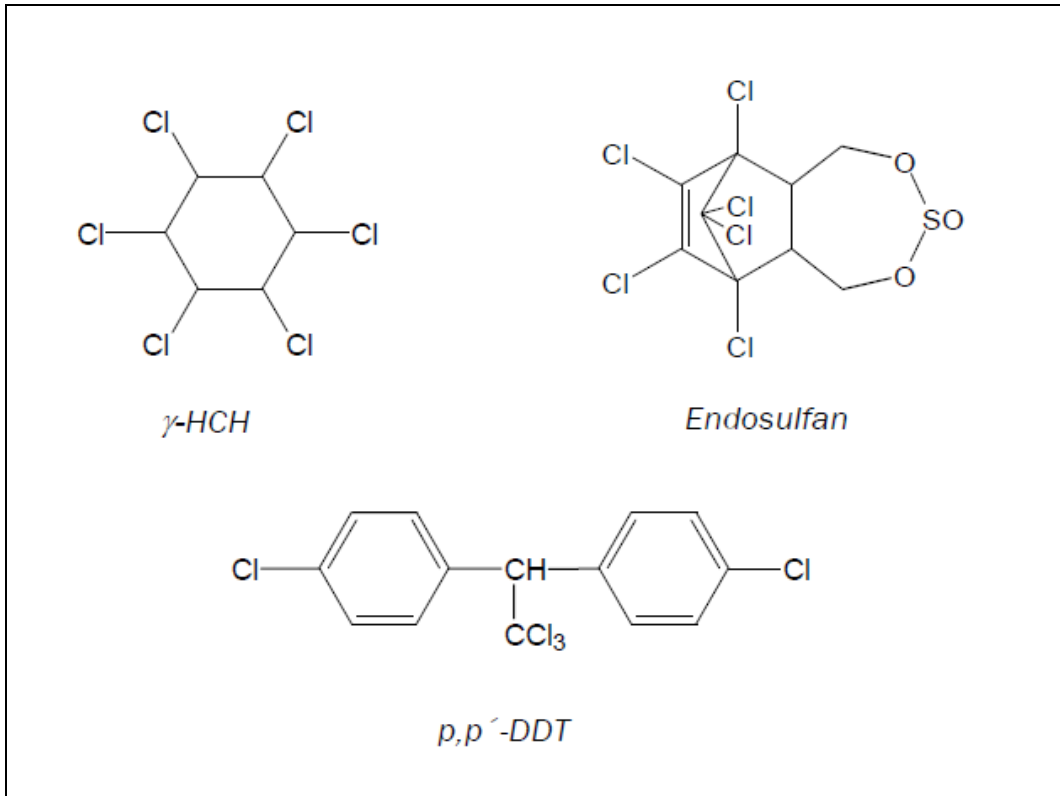
- Insecticidas
- Acaricidas
- Fungicidas
- Herbicidas
- Nematicidas
- Rodenticidas

## **2.5. Pesticidas representativos**

### **2.5.1. Pesticidas organoclorados**

En este grupo se incluyen los plaguicidas cuya estructura química corresponde a hidrocarburos clorados aromáticos, aunque algunos de ellos contienen otros elementos, como oxígeno y azufre.

A continuación se muestran las estructuras químicas de compuestos representativos de los Organoclorados.



- **Propiedades:** Son poco solubles en agua, estables a la luz solar, a la humedad, al aire y al calor, lo que los hace bastante persistentes en el medio ambiente y se bioacumulan en los seres vivos.
- **Tóxico cinética:** Pueden ingresar al organismo a través de los sistemas digestivo, respiratorio o por la piel.

La principal acción tóxica de los organoclorados la ejercen sobre el sistema nervioso, aumentando la irritabilidad de las neuronas, se acumulan en los tejidos grasos, pudiendo causar intoxicación crónica.

El metabolismo de los organoclorados se lleva a cabo lentamente en el hígado, transformando las moléculas liposolubles en hidrosolubles, se eliminan lentamente a través de la bilis, heces, orina y leche materna.

- **Sintomatología:** Incluye hiperestesia y parestesias en cara y extremidades, aunque también pueden presentarse vértigo, incoordinación, temblor y confusión mental. En casos de ingestión se presentan cuadros de irritación gastrointestinal (vómito y diarrea).

En los casos más severos de intoxicación se presentan contracciones mioclónicas, seguidas de convulsiones tónico-clónicas que aparecen antes de 48 horas. Las altas concentraciones de estas sustancias aumentan la irritabilidad cardíaca, pudiendo producir arritmias. También pueden presentarse coma y depresión respiratoria.

La exposición a vapores de organoclorados puede producir irritación de ojos, nariz y orofaringe, síntomas que desaparecen al suspender la exposición.

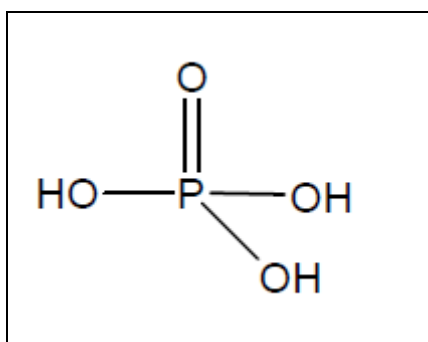
- **Tratamiento**

- ❖ Retirar al individuo del sitio de exposición y trasladarlo a un lugar ventilado.
- ❖ Vigile la vía aérea y administre oxígeno.
- ❖ Vigile la función cardiopulmonar
- ❖ Quite la ropa, lave el cabello y la piel contaminados con abundante agua y jabón.
- ❖ En caso de contacto ocular, irrigue con abundante agua o solución salina isotónica a baja presión durante 15 minutos o más.
- ❖ Si el paciente está consciente administre carbón activado.
- ❖ Lavado gástrico.
- ❖ Tratar convulsiones: diazepam
- ❖ Arritmias, Tratar fibrilación ventricular

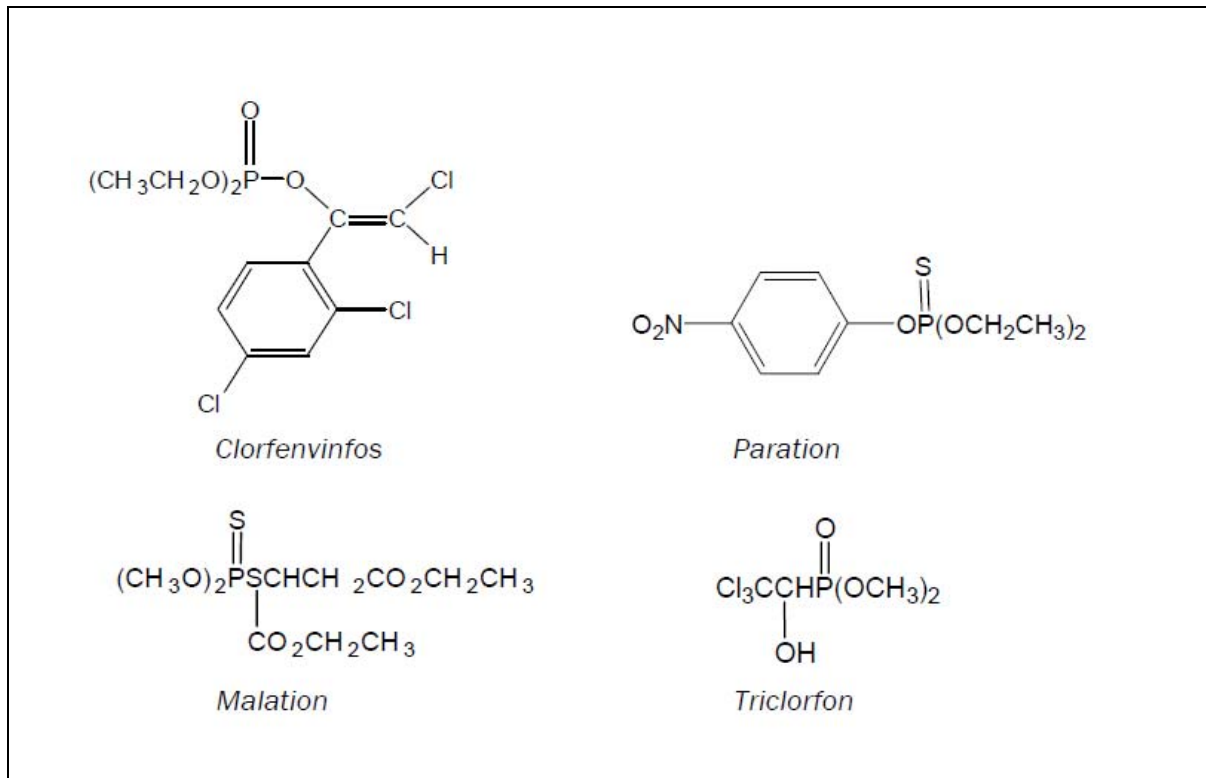
### 2.5.2. Pesticidas organofosforados

Los insecticidas organofosforados los podemos caracterizar por su mecanismo de acción y su estructura química similar, la toxicidad se produce por inhibición de la acetilcolinesterasa. En la actualidad es uno de los grupos de plaguicidas más ampliamente utilizados en la agricultura.

Los organofosforados son ésteres del ácido fosfórico (unión de un ácido y un alcohol), expresado por su fórmula desarrollada.



Dentro de los productos comerciales más conocidos de este grupo de plaguicidas están:



- **Propiedades:** Son productos poco solubles en agua, muy solubles en solventes orgánicos, generalmente liposolubles, son poco volátiles, inestables en el medio ambiente por lo que no se acumulan como residuos. La principal forma de degradación en el ambiente es la hidrólisis, especialmente bajo condiciones alcalinas, lo que tiene importancia en el proceso de destrucción del plaguicida.
- **Tóxico cinética:** Pueden penetrar al organismo por inhalación, ingestión y a través de la piel intacta, debido a su alta liposolubilidad, fenómeno de absorción que se acelera con las altas temperaturas o en presencia de escoriaciones o dermatitis.

Se distribuyen rápidamente por todo los órganos y tejidos, aunque las concentraciones más elevadas alcanzan el hígado y los riñones, los compuestos más lipofílicos pueden almacenarse en pequeñas proporciones en los tejidos grasos y el tejido nervioso.

El mecanismo a través del cual producen toxicidad es con la inhibición de la acetil colinesterasa (ACE), la enzima responsable de la destrucción y terminación de la actividad biológica del neurotransmisor acetilcolina (AC).

Con la acumulación de la AC se altera el funcionamiento normal de las fibras nerviosas. Los organofosforados son inhibidores irreversibles de la ACE.

Son fácilmente excretables a través de la orina por un periodo que oscila entre las 24 y 48 horas.

- **Sintomatología:** Los signos y síntomas aparecen entre la primera y segunda hora después de la exposición, sin embargo, pueden desarrollarse hasta varias horas más tarde, esto depende principalmente de su solubilidad en grasa y si requieren o no activación metabólica. En exposiciones de tipo dérmica los síntomas son tardíos.

Muscarínicos: vómitos, diarreas, dolor y calambres abdominales, bradicardia, broncoespasmo, miosis y aumento de la sudoración y salivación.

Efectos nicotínicos: calambres musculares, taquicardia, hipertensión, fasciculaciones y parálisis respiratoria, en algunos casos se puede observar midriasis.

Efectos en el sistema nervioso central: Agitación, confusión, delirio, convulsiones, coma y muerte.

Neuropatía Retardada: Daño en los axones de los nervios periféricos y centrales que se ha asociado con la inhibición de la esterasa neurotóxica.

Este síndrome se caracteriza por debilidad o parálisis y parestesia de extremidades, principalmente inferiores. La neuropatía inducida por este

tipo de agente se puede manifestar 1 a 3 semanas después de la exposición y perdurar semanas, meses o años.

*Síndrome Intermedio:* Este ocurre después de la resolución de una crisis colinérgica aguda y dentro de un período de 24 – 96 horas, la cual se caracteriza por parálisis respiratoria y debilidad muscular facial de cuello y de los músculos proximales de las extremidades. Este síndrome es el resultado al parecer de una alteración pre y post sináptica de la transmisión neuromuscular.

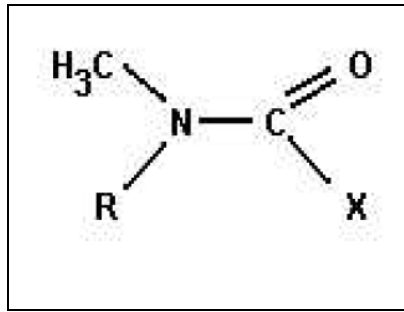
- **Tratamiento**

- ❖ Retirar al paciente de la exposición.
- ❖ Quitarle la ropa contaminada.
- ❖ Mantenimiento de la respiración. ABC
- ❖ Oxigenoterapia
- ❖ Control de convulsiones.
- ❖ Lavado minucioso con agua y jabón
- ❖ Si ha sido ingerido, provocar el vómito.
- ❖ Lavado gástrico siempre que no existan contraindicaciones
- ❖ Carbón Activado
- ❖ Aplicación de atropina.

### **2.5.3. Pesticidas carbamatos**

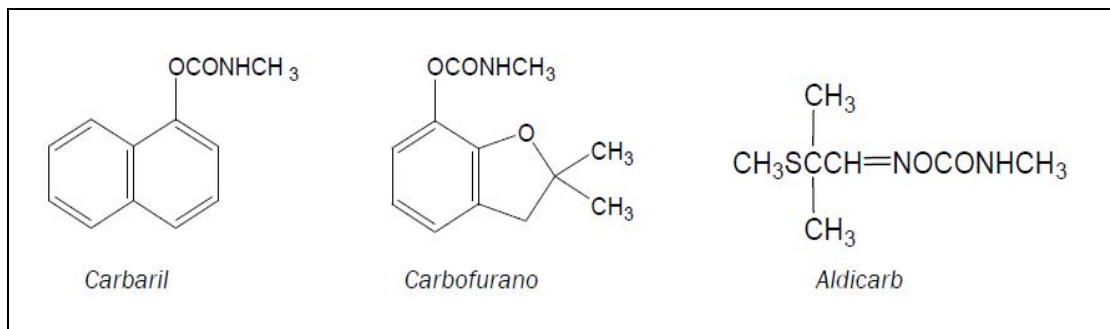
Los carbamatos son sustancias orgánicas de síntesis conformadas por un átomo de nitrógeno unido al ácido carbámico.

Su estructura química es la siguiente:



En donde R es H o un grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) y X es un alcohol que determina el grado de acoplamiento al centro activo de las colinesterasas y por lo mismo, su capacidad inhibidora.

Estructuras químicas de insecticidas carbámicos.



- **Propiedades:** Son plaguicidas no bioacumulables que desaparecen rápidamente por hidrólisis y fotodegradación, poseen alta toxicidad, baja estabilidad química y su nula acumulación en los tejidos.
- **Tóxico cinética:** ingresan por la vía cutánea, respiratoria o digestiva. No se acumulan en el organismo, su biotransformación se realiza a través de tres mecanismos básicos: hidrólisis, oxidación y conjugación. La eliminación se hace principalmente por vía urinaria.
- **Sintomatología:** Los síntomas y señales están basados en la estimulación colinérgica excesiva. Los envenenamientos carbamáticos tienden a ser de



corta duración debido a que la inhibición del tejido nervioso ACE es reversible, y los carbamatos son metabolizados más rápidamente.

Los síntomas iniciales de toxicidad seria son la depresión del sistema nervioso central, manifestado a través de coma, convulsiones, hipotonía y efectos nicotínicos, incluyendo la hipertensión y la depresión cardio respiratoria. La disnea, bronco espasmos y broncorrea con una eventual edema pulmonar son otras señales serias.

El malestar, debilidad muscular, mareo y transpiración son síntomas iniciales de envenenamiento. El dolor de cabeza, salivación, náusea, vómito, dolor abdominal y diarrea son a menudo notorios. La miosis con visión borrosa, incoordinación, espasmos musculares y lenguaje lento también son informados.

- **Tratamiento**

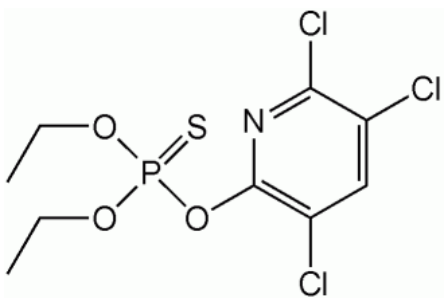
- ❖ Monitorización de signos vitales
- ❖ Mantenimiento de vía aérea permeable
- ❖ Oxigenoterapia
- ❖ Lavado gástrico
- ❖ La administración de carbón activado
- ❖ Retirar toda la ropa y lavar al paciente con agua y jabón de cabeza a pies durante al menos diez minutos.

#### **2.5.4. Pesticidas en estudio:**

- **Clorpirifos:**

Es un insecticida de amplio uso en la vivienda y en la agricultura. El clorpirifos se ha utilizado en las casas para controlar las cucarachas, pulgas y termitas; en la agricultura se utiliza para controlar las garrapatas del ganado y se rocía en los cultivos para controlar las plagas.

El clorpirifos es un sólido blanco de apariencia cristalina y de aroma fuerte. Moderadamente persistente hasta 1 año. No se mezcla bien con el agua, de manera que generalmente se mezcla con líquidos aceitosos antes de ser aplicado a los cultivos o a los animales. También se puede aplicar a los cultivos en forma de micro cápsulas. El clorpirifos es el ingrediente activo de varios insecticidas comerciales, como por ejemplo los productos Dursban® y Lorsban®.

<b>Estructura química:</b> 	<b>Nombre químico (IUPAC):</b> O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridil)fosforotioato
	<b>Fórmula química:</b> C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS
	<b>Peso molecular:</b> 350.6

- **Propiedades Físico Químicas:** Se encuentra en estado sólido cristalino, su color es blanco o marrón, su olor es ligeramente como acre, su punto de fusión es de 41,5°C – 42,5 °C, su punto de ebullición > 300°C, presión de vapor 3,35 mPa a 25°C, Densidad 1,51 g/ml a 21°C.

#### Solubilidad, media

Acetona	>400 g/L a 20°C
Diclorometano	>400 g/L a 20°C
Acetato etilo	>400 g/L a 20°C
Metanol	250 g/100mL a 20°C
Tolueno	>400 g/L a 20°C
n-Hexano	>400 g/L a 20°C
Agua	1,05 ppm (p/v a 25°C)

- **Persistencia y Degradación:** En el aire puede hallarse en forma de vapor y partículas. La reacción con radicales hidroxilo elimina el vapor de la atmósfera y la precipitación húmeda y seca remueve las partículas. La fotólisis directa también está involucrada en la destrucción de este plaguicida en el aire. Es moderadamente persistente en suelo.

Su vida media en los sistemas terrestres varía usualmente entre 60 y 120 días, pero puede abarcar un intervalo de 2 semanas hasta 1 año dependiendo del tipo de suelo, el clima y otras condiciones. Su permanencia disminuye a pH básico, pero se incrementa en condiciones anaerobias.

Su movilidad en suelo es baja o nula porque se une fuertemente a las partículas, por ello son pocas sus posibilidades de lixiviarse y contaminar las aguas subterráneas.

Los mecanismos de eliminación de este compuesto en suelo incluyen la fotólisis, hidrólisis y biodegradación (vida media de 2 a 81 días). La volatilización también participa en suelos húmedos (vida media de 45 a 163 horas), pero no en suelos secos.

El TCP es su principal producto de degradación, cuya movilidad y persistencia son moderadas. En los cuerpos de agua, la persistencia del clorpirifos etil depende del tipo de formulación, siendo mayor en los concentrados emulsionables y polvos humectables. Cuando éstos se aplican, las concentraciones en agua disminuyen rápidamente debido a la adsorción firme a sedimentos y materia orgánica suspendida.

Para los gránulos y formulaciones de liberación controlada, las concentraciones que se alcanzan son menores, pero se mantiene por más tiempo.

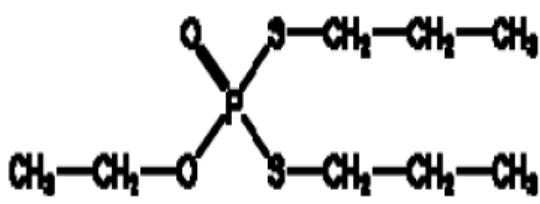
La volatilización es su principal ruta de disipación en el agua (vida media de 3.5 a 20 días), seguida de la fotólisis en la superficie y la hidrólisis a altas temperaturas y pH básico.

Su potencial de bioacumulación en organismos acuáticos puede variar de moderado a muy alto. Este plaguicida y sus metabolitos se acumulan en las plantas, pudiendo ser detectados en los cultivos 10 a 14 días después de su aplicación. La volatilización es la principal manera en que el clorpirifos se propaga después de su aplicación.

Una vez que se encuentra en el medio ambiente (suelo, aire o agua), el clorpirifos se descompone por efecto de la luz solar, las bacterias u otros procesos químicos.

○ **Ethopropos:**

Controla nematodos, parásitos de plantas e insectos del suelo en plantas ornamentales, papas, tomates, hortalizas, maíz, soja, maní, cucurbitáceas, fresas, cítricos, tabaco, plátanos, piña, caña de azúcar, pasto y otros cultivos.

<b>Estructura química:</b> 	<b>Nombre químico (IUPAC):</b> O-etil S,S-dipropil fosforoditioato
	<b>Fórmula química:</b> C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> O <sub>2</sub> PS <sub>2</sub>
	<b>Peso molecular:</b> 242.34

- **Propiedades Físico Químicas:** Líquido de color amarillo pálido. Su punto de fusión es igual a  $-13\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Tiene una densidad específica de  $1.094\text{ g/cm}^3$  a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Su solubilidad en agua es igual a  $750\text{ mg/L}$  a  $20 - 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Es muy soluble en acetona, etanol, xileno, 1,2-dicloroetano, dietil éter, acetato de etilo y ciclohexano. Esta sustancia no es corrosiva a los metales.
- **Persistencia y Degradación:** Moderadamente persistente. En el aire está presente únicamente como vapor, el cual es degradado en la atmósfera mediante reacciones con radicales hidroxilo, con un tiempo estimado de vida media de 5.6 horas. En el suelo tiene una alta movilidad y no se espera que se volatilice. Su vida media en los sistemas terrestres es 4.7 días en presencia de luz solar y de 12.3 días en la oscuridad. En los cuerpos de agua no se espera que sea adsorbido por los sólidos suspendidos y sedimentos. No se espera que se volatilice desde la superficie del agua. Su potencial de bioconcentración en organismos acuáticos es bajo.

La tóxica cinética de estos pesticidas fue analizada anteriormente dentro de los plaguicidas Organofosforados.

## **2.6. Métodos empleados en la determinación de pesticidas en alimentos**

### **2.6.1. Muestras**

El procedimiento se aplica a muestras de banano, sin distinción del lugar de recolección, las mismas fueron recolectadas al azar en diferentes clústers, estas son cubiertas con papel aluminio y el tamaño mínimo necesario se indica en la tabla 2.5, valor del cual se tomará 30 gr para el análisis.

**Tabla 2.5: Tamaño mínimo de recolección de la muestra de banano**

<b>CLASIFICACION DE PRODUCTOS</b>	<b>EJEMPLOS</b>	<b>NATURALEZA DE LAS MUESTRAS PRIMARIAS QUE HAN DE TOMARSE</b>	<b>TAMAÑO MINIMO DE CADA MUESTRA DE LABORATORIO</b>
Productos frescos de tamaño pequeño, generalmente unidades < 25 g	Bayas, guisantes, aceitunas	Unidades enteras, envasadas o tomadas con un instrumento de muestreo	1 Kg
Productos frescos de tamaño medio, generalmente unidades 25 - 250 g	Manzanas, naranjas	Unidades enteras	1 Kg (al menos 10 unidades)
Productos frescos de tamaño grande, generalmente unidades > 250 g	Coles, pepinos, uvas (racimos)	Unidades enteras	2 Kg (al menos 5 unidades)

Fuente: Ministerio de Salud de Chile

### **2.6.2. Métodos de extracción de pesticidas**

La extracción es la primera etapa de la preparación de la muestra, ésta debe ser homogénea y representativa. El objetivo es aislar el analito de la matriz de la forma más completa posible evitando la presencia de interferencias. Por tanto, hay que evaluar la naturaleza no sólo del analito sino también de la matriz, para que esta etapa sea lo más eficiente posible.

Se aplica a todo tipo de mezclas ya sean sólidas, líquidas o gaseosas.

Como se indica en la Tabla 2.6 existen diferentes métodos de extracción de pesticidas en alimentos.

Tabla. 2.6. Técnicas de extracción de pesticidas

TECNICA DE EXTRACCION	DISOLVENTE	PASOS DE LIMPIEZA	PESTICIDAS IDENTIFICADOS
<b>QuEChERS</b>		Extracción dispersiva en fase sólida	Isocarbofos, metil isofenfos
	Acetonitrilo	---	De 31 a 130 pesticidas multiclase
	Acetato de Etilo	Extracción dispersiva en fase sólida	78 pesticidas multiclase
<b>Sólido - Líquido</b>		Extracción dispersiva en fase sólida	151 pesticidas multiclase
	Acetonitrilo	---	72 pesticidas multiclase
		---	Endosulfán, metamidofos, metalaxil
	Diclorometano	---	Pesticidas clorados
	Acetona	---	Clorpirifos
<b>Líquido - Líquido</b>	Acetona, éter y diclorometano	Extracción en fase sólida	13 pesticidas multiclase
<b>Fluidos supercíticos</b>	CO <sub>2</sub>	---	Pesticidas multiclase
<b>Asistida en microondas</b>	---	Micro extracción en fase sólida	Bifentrin, acrinatrin, deltametrin y λ-cihalotrin

Fuente: Determinación de pesticidas en vegetales mediante cromatografía de gases-espectrometría de masa/masa (GC-MS/MS)

o **Técnica QuEChERS**

QuEChERS son las siglas de *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*, es decir, rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro.

Surgió de la necesidad de desarrollar métodos multiresiduos rápidos y económicos pero que proporcionaron resultados de gran calidad y fiabilidad.

Consiste en una extracción de una pequeña cantidad de muestra representativa y homogénea (10–15 g) con un disolvente miscible con el agua, como el acetonitrilo o la acetona, seguida de la adición de sales como el cloruro sódico o el sulfato magnésico. La adición de éstas induce la separación de las dos fases y que el analito migre de la fase acuosa a la fase orgánica consiguiéndose recuperaciones muy altas incluso con pesticidas polares y solubles en agua.

Después de agitar la muestra, ésta se centrifuga y una alícuota de la fase orgánica se somete a un proceso de purificación empleando la extracción en fase sólida dispersiva. En este caso, se añade una pequeña cantidad de adsorbente al extracto que se agita y se centrifuga, en lugar de pasar el extracto por un cartucho relleno con el adsorbente previamente acondicionado.

El sobrenadante se puede analizar directamente o se puede concentrar para reconstituirlo en un disolvente adecuado para su análisis.

- **Extracción Sólido Líquido**

En el caso de muestras sólidas se lleva a cabo la *extracción sólido-líquido* en la que los analitos se transfieren desde la matriz al disolvente seleccionado.

La eficiencia de la extracción depende de tres factores relacionados entre sí como son la solubilidad, la transferencia de masa y el efecto de la matriz. La solubilidad de un analito depende del tipo de disolvente y está influenciada por la temperatura y la presión. La transferencia de masa depende del tamaño de partícula de la matriz y se ve favorecida por el uso de disolventes de baja viscosidad, la agitación, temperatura, presión elevadas y un tamaño de partícula pequeño.



La extracción sólido-líquido se puede realizar de distintas formas dependiendo de la fortaleza de las interacciones entre los analitos y la matriz, así tenemos:

La extracción con Agitación: se lleva a cabo sumergiendo la muestra en un disolvente orgánico y agitando la mezcla para producir la transferencia del analito de la matriz al disolvente para a continuación filtrar o centrifugar la solución. El proceso se repite dos o más veces, combinando los extractos obtenidos al final.

Esta es la técnica de extracción aplicada en la investigación. Se uso como disolventes acetona y diclorometano, es relativamente sencilla, rápida, su porcentaje de recuperación depende de la minuciosidad del técnico y de pérdida de la muestra.

Extracción Soxhlet: los analitos fuertemente retenidos en la matriz, necesitan ser sometidos a una temperatura elevada para mejorar la cinética del proceso extractivo.

Es muy común el análisis de alimentos empleando esta técnica porque no requiere una posterior filtración, la temperatura a la que se realiza la extracción es mayor que la temperatura ambiente y la muestra entra en contacto con el disolvente limpio repetidamente por lo que se favorece la transferencia y la solubilidad de los analitos.

Extracción Asistida por Radiación de Ultrasonidos o Sonicación: utiliza las vibraciones ultrasónicas para asegurar el contacto íntimo entre la muestra y el disolvente. La sonicación permite extraer pesticidas termolábiles ya que se lleva a cabo a temperatura ambiente y es rápida sin embargo la eficiencia de la extracción no es

tan elevada como en otras técnicas extractivas y puede llevar a la degradación de algunos compuestos.

- **Extracción Líquido – Líquido**

La extracción líquido-líquido se basa en el reparto del analito entre dos líquidos inmiscibles. La eficiencia del proceso depende de factores como la afinidad del analito por el disolvente y el número de extracciones sucesivas que se lleven a cabo.

Consiste en separar una o varias sustancias disueltas en un disolvente mediante su transferencia a otro disolvente insoluble, o parcialmente insoluble, en el primero. La transferencia de materia se consigue mediante el contacto directo entre las dos fases líquidas.

- **Extracción Con Fluidos Supercríticos**

Los fluidos supercríticos tienen densidades similares a las de los líquidos pero con coeficientes de difusión mayores y viscosidades más bajas, similares a la de los gases, por lo que la extracción es más rápida que con líquidos orgánicos.<sup>5</sup>

El poder disolvente de un fluido supercrítico puede modificarse por los cambios de la presión y, en menor proporción, por la temperatura. Por el contrario, el poder disolvente de un líquido orgánico es prácticamente constante e independiente de las condiciones.

En la extracción con fluidos supercríticos, las muestras se colocan en una celda de extracción y se bombea el fluido correspondiente hasta alcanzar la presión y la temperatura deseadas. Después de la

---

<sup>5</sup> Albero, María, Determinación de Residuos de Contaminantes Orgánicos en Miel y Zumos, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, 2008

extracción, el fluido se despresuriza y se recoge el extracto limpio en una trampa adsorbente o en un disolvente para su análisis. Las muestras deben ser previamente desecadas, para evitar la posible obstrucción de la válvula restrictora por la formación de hielo, lo que se puede llevar a cabo mediante la liofilización de las muestras o bien añadiendo un agente desecante.

- **Extracción Asistida por Microondas**

Ha aparecido como una clara alternativa a la extracción Soxhlet ya que permite un calentamiento más rápido y eficiente de la muestra.

La muestra se extrae aplicando energía de microondas en un disolvente adecuado. Este tipo de radiación permite el calentamiento selectivo de la muestra según el disolvente utilizado. Esta técnica de extracción depende de la matriz y limita los disolventes que se pueden emplear, ya que conviene que éstos no sean transparentes a la radiación de microondas, sin olvidar la solubilidad de los analitos en los mismos.

Las muestras junto con el disolvente de extracción se irradian con las microondas durante cortos periodos de tiempo y como consecuencia se produce un aumento de la temperatura que favorece la transferencia de los compuestos retenidos en la matriz al disolvente. Esta técnica extractiva es rápida, ya que los tiempos de irradiación son muy cortos y, además, se pueden extraer varias muestras simultáneamente.

Los parámetros a tener en cuenta a la hora de optimizar un método basado en la extracción asistida por microondas son la composición del agente extractante y su volumen, la temperatura y el tiempo de extracción, así como la naturaleza de la matriz.

## **2.7. Separación, identificación y cuantificación de pesticidas**

Una vez tomada la muestra, la identificación y cuantificación de los pesticidas se realiza por Cromatografía de Gases con detectores selectivos acoplados al equipo.

### **2.7.1. Cromatografía de gases**

La cromatografía en fase gaseosa es un procedimiento para la separación de compuestos volátiles, que fluyen en una corriente gaseosa a través de una fase estacionaria. El gas portador es un gas inerte, por ej., nitrógeno, helio, hidrógeno y argón, éste transporta una muestra representativa de la sustancia inyectada.

La cromatografía de gases se emplea principalmente para pesticidas que se vaporizan fácilmente sin degradarse, con puntos de ebullición por debajo de los 250°C y polaridades bajas o intermedias en el análisis.

- **Esquema de un cromatógrafo de gases**

Las partes esenciales de un equipo cromatográfico son (Figura 2.1):

- Fuente de gas portador
- Sistema de inyección de las muestras.
- Columna cromatográfica
- Sistema de detección

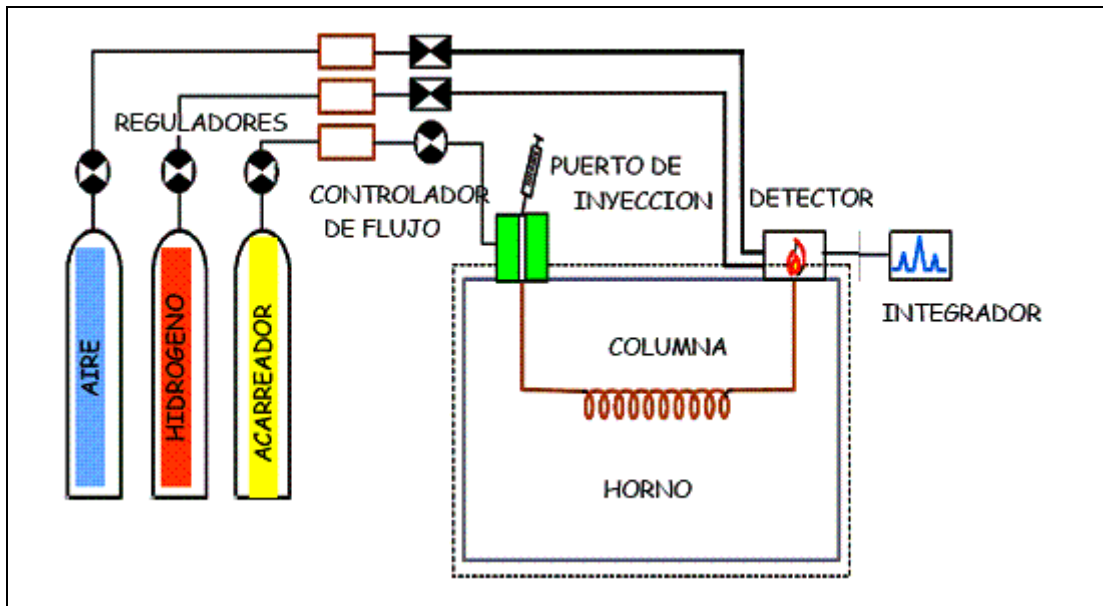


Figura 2.1. Esquema de un cromatógrafo de gases

- **El gas portador, fase móvil o carrier:** transporta los compuestos a través de la columna, es un gas inerte, generalmente helio, nitrógeno hidrógeno, de elevado grado de pureza. El caudal del mismo que pasa por la columna, ha de ser conocido y controlado por medio de reguladores de presión, manómetros y medidores de flujo.

Con ciertos tipos de columnas y detectores, se requiere el uso de un gas de complemento en el detector ("make-up"), el cual es un gas de arrastre adicionado al efluente de la columna antes de que pase al detector.

El nitrógeno, helio e hidrógeno suele utilizarse con los detectores de ionización de llama (FID). El argón con el detector de captura electrónica (ECD). El helio e hidrógeno con el detector de conductividad térmica (TCD), por su elevada conductividad; si bien el hidrógeno es un fuerte reductor, lo que puede limitar su uso.

- **Sistema de inyección:** El Inyector es el lugar por donde se introduce una pequeña cantidad de muestra (del orden de  $1 \text{ cm}^3$  de gas o  $1 \mu\text{L}$  de líquido) en medio de la corriente de gas "carrier". (Figura 2.2)

Los líquidos se inyectan mediante una jeringa, a través de un disco (septo) de goma, en un inyector caliente que contiene un tubo de vidrio silanizado. El gas portador arrastra la muestra vaporizada desde el inyector a la columna. Los productos de descomposición y los componentes no volátiles de la muestra se van acumulando en el tubo de vidrio (insertos), que se debe reemplazar periódicamente.

Los gases se suelen inyectar, con una jeringa hermética a gases, en el mismo tipo de lazo de muestras usado en cromatografía de líquidos.

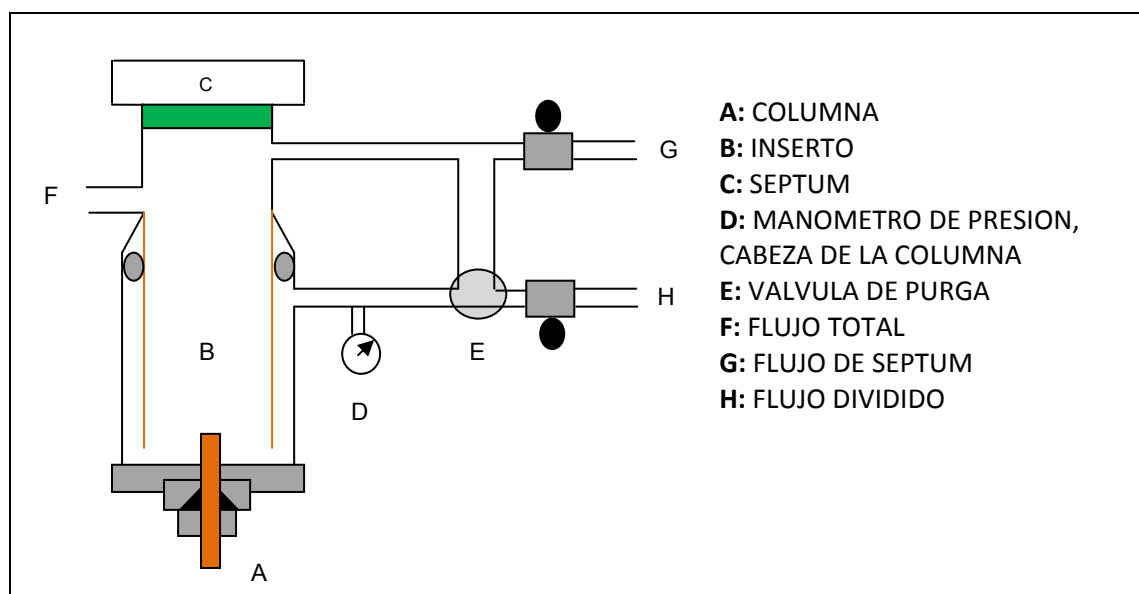


Figura 2.2. Sistema de inyección

Insertos: El inserto depende del método de inyección, este debe reemplazarse regularmente y es donde se condensa la suciedad (Figura 2.3).

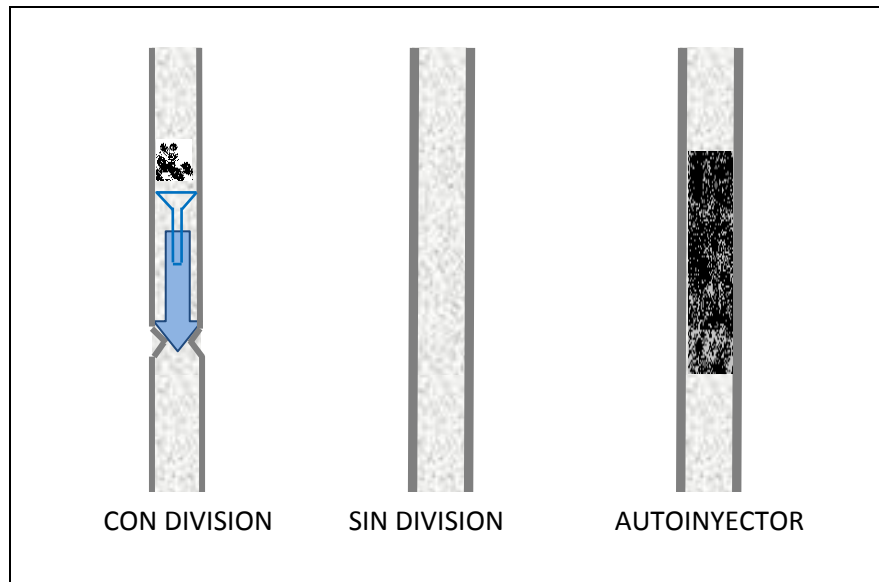


Figura 2.3. Insertos

Si el volumen expandido térmicamente de la muestra es mayor que el volumen del inserto, se obtiene resultados erráticos.

- Inyección con división: Se emplea cuando se tiene concentraciones altas de los analitos, es preferible una **inyección con división** (*split injection*) para introducir la muestra en la columna. (Figura 2.4)

Una inyección total contiene demasiada cantidad de muestra para una columna de un diámetro igual o menor que 0,32mm. Una inyección con división introduce sólo entre 0,2 y 2% de muestra en la columna.

La muestra se inyecta rápidamente en la columna a través del septo en la zona de evaporación. La temperatura del inyector se mantiene alta, para facilitar una evaporación rápida. El flujo de gas portador arrastra rápidamente la muestra a la cámara de mezcla, donde tiene

lugar su completa vaporización y homogeneización. En el punto de división, una pequeña fracción del vapor entra en la columna cromatográfica, mientras que la mayor parte se desecha, pasando a través de una válvula de aguja. El regulador de presión, controla la fracción de muestra que se descarta. La proporción de muestra que no entra en la columna se llama razón de división, y normalmente va de 50:1 a 600:1. Una vez que se ha eliminado la muestra del inyector (~30s), se cierra la válvula de división, y se reduce a su vez el caudal de gas portador.

La temperatura del inyector debe ser suficientemente alta para minimizar el fraccionamiento de la muestra y no debe descomponerla.

Durante la inyección y el proceso cromatográfico, sigue pasando gas de *purga de septum*, a través de la válvula de aguja, a un caudal de ~1ml/min, con objeto de eliminar el exceso de vapores de muestra y de gases que puedan sangrar del septum de goma.

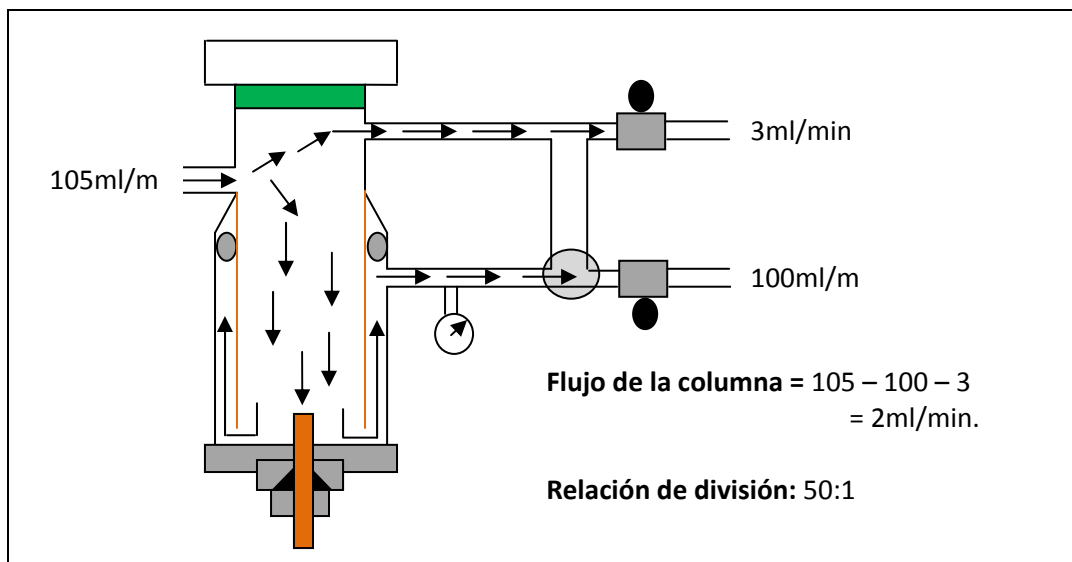


Figura 2.4. Inyección con división de flujo



Tiempo de Purga: Se debe dejar suficiente tiempo para que los analitos de interés entren a la columna, si el tiempo es excesivo, al entrar demasiado solvente a la columna el enfoque de bandas angostas se pierde.

El tiempo óptimo se logra mediante una serie de inyecciones, haciendo cambiar el tiempo de purga, este tiempo se lo obtiene cuando todos los analitos presentan una respuesta máxima y se logra típicamente entre 30 y 60seg.

Inyección sin división: Es apropiada para análisis de trazas de analitos que constituyen menos de 0,01% de la muestra. Se usa el mismo inyector para inyección con división. Sin embargo, el tubo interior (guía) es un tubo recto vacío, sin cámara de mezcla. Se inyecta dentro de la guía un volumen grande (~2 $\mu$ L) de disolución diluida en un disolvente de bajo punto de ebullición, con la válvula de escape cerrada (Figura 2.5).

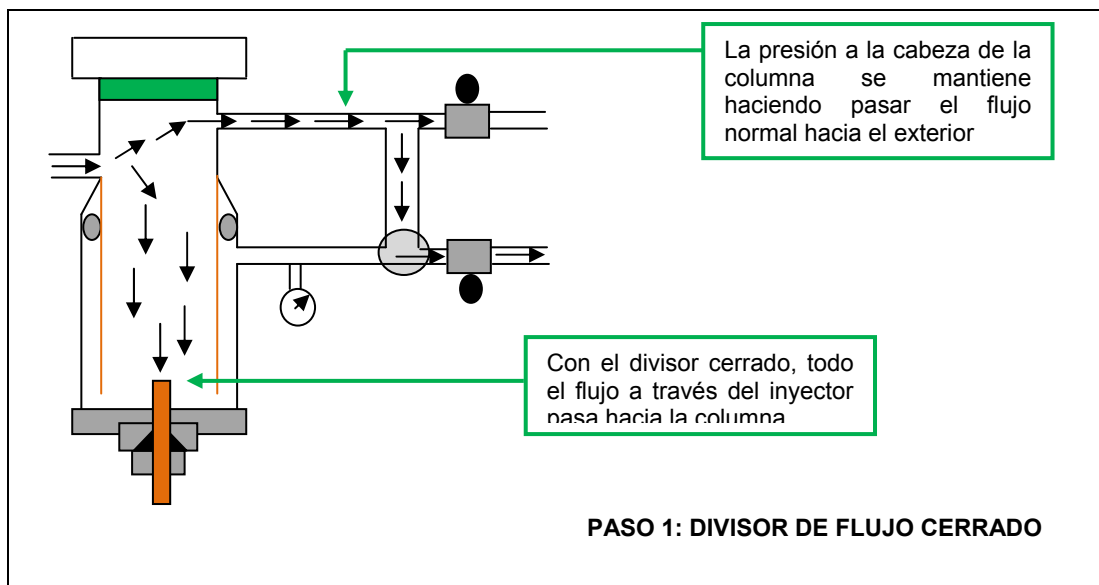


Figura 2.5. Divisor de flujo cerrado

Durante la inyección y la separación cromatográfica se mantiene un pequeño caudal a través de la purga del septo, para eliminar los vapores que se puedan escapar de la guía de inyección (Figura 2.6).

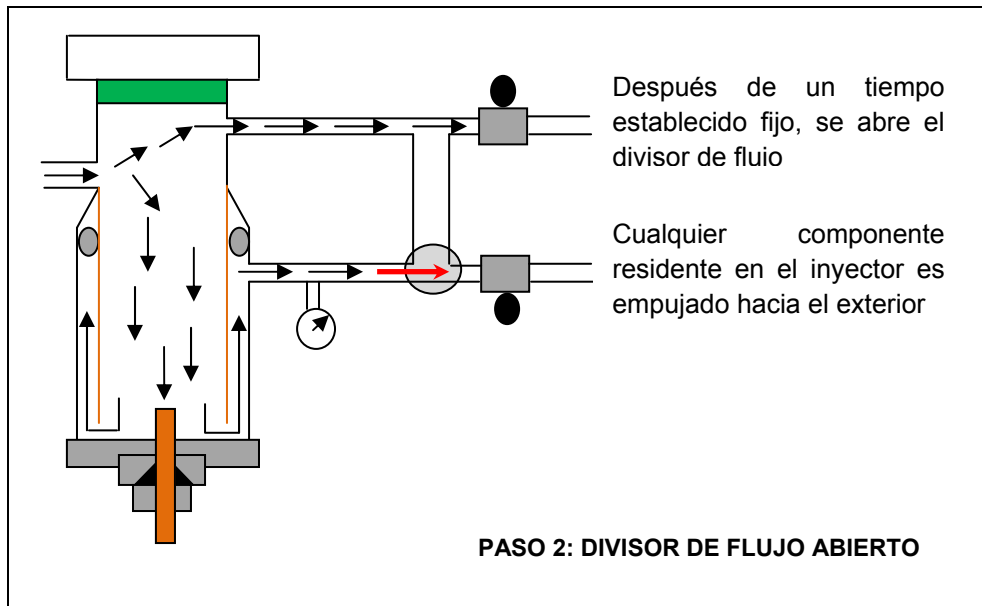
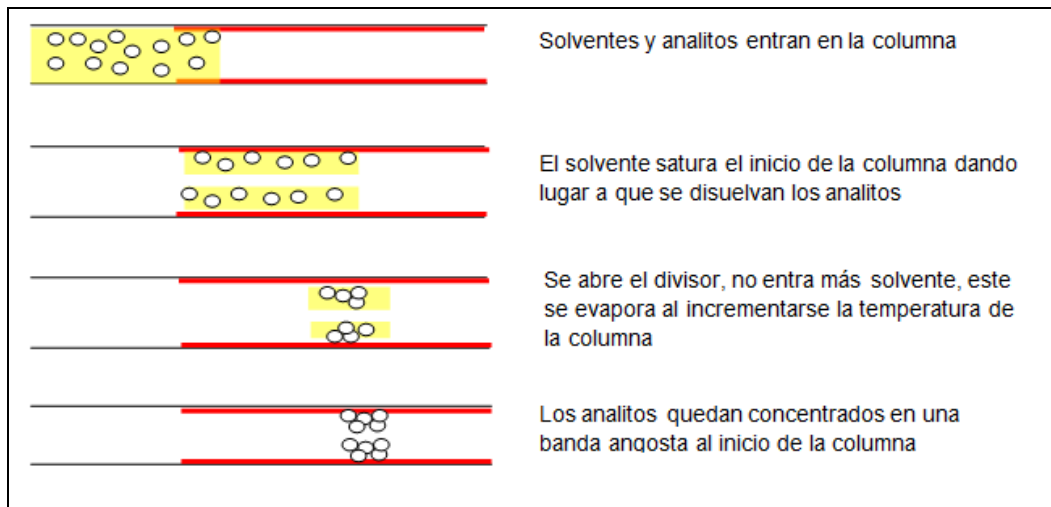


Figura 2.6. Divisor de flujo abierto

El solvente debe ser más volátil que los analitos de interés, la temperatura del inyector en la inyección sin división es menor  $\sim 220^{\circ}\text{C}$ , porque la muestra pasa mucho más tiempo en el inyector, y se debe evitar que se descomponga térmicamente la muestra, la temperatura inicial de la columna se fija en  $40^{\circ}\text{C}$  por debajo del punto de ebullición del disolvente, que condensa por tanto en la cabeza de la columna.

Bajo las condiciones descritas, solamente una pequeña fracción del solvente entra en la columna. Allí actúa como trampa para los analitos, ayudando a enfocarlos (Figura 2.7) es decir que los analitos se disuelvan en la fase estacionaria, logrando bandas estrechas de aplicación que se traducen en picos estrechos.

Enfoque con solvente:



**Figura 2.7. Enfoque con solvente**

En la inyección sin división, pasa a la columna ~80% de la muestra, y durante la inyección sólo se da un pequeño fraccionamiento.

- **Sistema de Columnas:**

El sistema de columnas cromatográficas constituye el corazón de todo cromatógrafo. Cada columna se diseña para aprovechar alguna propiedad de los diferentes componentes que resulte adecuada para generar distintas velocidades de avance para cada uno de ellos durante el recorrido de la columna.

La columna cromatográfica se encuentra en el interior de un horno termostaticado. La temperatura de la columna debe ser lo suficientemente alta como para asegurar que los componentes de la muestra atraviesen la columna a una velocidad razonable.

Sin embargo, no puede ser mayor que el punto de ebullición de la muestra. Se debe tener en cuenta que la temperatura de la columna debe operar a una temperatura a la que la muestra está en estado vapor, pero no debe estar en estado de gas.

Puede trabajarse a temperatura constante o con programación de temperaturas, las técnicas utilizadas implican el uso de sistemas isotermos donde la temperatura de la columna se mantiene constante o de temperatura programada (PTGC), donde la columna se somete a un incremento lineal de la temperatura con el tiempo.

- **Columnas de relleno:** Las actuales columnas de relleno se fabrican con tubo de vidrio, acero inoxidable, cobre, aluminio, o de teflón, con una longitud característica de 1 a 3 m y un diámetro interno de 2 a 4 mm. Estos tubos se empaquetan densamente con un material de relleno sólido, finamente dividido y homogéneo, que se recubre con una delgada capa (0,05 a 1  $\mu\text{m}$ ) de la fase estacionaria líquida. Con objeto de poder introducir las en un horno termostático, los tubos se configuran en forma helicoidal con un diámetro aproximado de unos 15 cm.
- **Columnas capilares, o capilares abiertas,** son de dos tipos básicos, denominados capilares de pared recubierta (WCOT) y capilares con soporte recubierto (SCOT). Las columnas de pared recubierta son simplemente tubos capilares con la pared interna recubierta de una fina capa de fase estacionaria. En las columnas abiertas con soporte recubierto, la superficie interna del capilar está revestida de una fina capa (de unos 30  $\mu\text{m}$ ) de un material soporte, tal como tierra de diatomeas. Este tipo de columnas contiene varias veces la fase estacionaria de una columna capilar de pared recubierta y, por tanto, tienen una mayor capacidad de carga.

Al principio, las columnas WCOT se construían de acero inoxidable, aluminio, cobre o plástico, posteriormente se utilizó el vidrio.

Las columnas capilares de sílice están disponibles en el comercio, y ofrecen importantes ventajas tales como resistencia física, una reactividad mucho menor frente a los componentes de la muestra y flexibilidad. En la mayoría de las aplicaciones, han sustituido a las antiguas columnas de vidrio WCOT.

Las columnas capilares de sílice más frecuentemente utilizadas tienen diámetros internos de 320 y 250  $\mu\text{m}$ .

El menor diámetro interno, la longitud significativa, el carecer de material de empaque y menor capacidad de carga, permite que los componentes residan mayor tiempo en la columna, lográndose picos de buena forma y muy definidos.

- Fase estacionaria

La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido que se queda fijo en la misma posición. La fase móvil puede ser un líquido o un gas que corre a través de una superficie y de la fase estacionaria. Las sustancias que están en un sistema de cromatografía interactúan tanto con la fase estacionaria como con la fase móvil. La naturaleza de estas interacciones depende de las propiedades de las sustancias así como también de la composición de la fase estacionaria.

En el caso de una mezcla en la que cada componente interactúa diferente con la fase móvil y la fase estacionaria, cada uno de ellos se moverá diferente.

En la siguiente tabla 2.6 se observan diferentes fases móviles y fases estacionarias en diferentes técnicas de cromatografía:

**Tabla. 2.7. Fase móvil y estacionaria en diferentes técnicas cromatográficas**

<b>Técnica</b>	<b>Fase móvil</b>	<b>Fase estacionaria</b>
Cromatografía de gases	Gas	Sólido o líquido
Cromatografía líquida en fase inversa	Líquido (polar)	Sólido o líquido (menos polar)
Cromatografía líquida en fase normal	Líquido (menos polar)	Sólido o líquido (polar)
Cromatografía líquida de intercambio iónico	Líquido (polar)	Sólido
Cromatografía líquida de exclusión	Líquido	Sólido
Cromatografía líquida de adsorción	Líquido	Sólido
Cromatografía de fluidos supercríticos	Líquido	Sólido

Fuente: Compendio de análisis químico cuantitativo

La fase estacionaria de una columna cromatográfica reúne una serie de requisitos:

- Baja volatilidad, su punto de ebullición debe de ser por lo menos 100°C superior a la temperatura máxima de operación de la columna.
- Estabilidad térmica.
- Inercia química.

Debe buscarse que la fase estacionaria disuelva los componentes de la mezcla, aplicando generalmente el principio de que lo semejante disuelve a lo semejante.

- **Sistema de detección:** El detector tiene por objeto medir la variación de alguna propiedad física del gas portador originada por la elución de

los compuestos. La temperatura del detector ha de ser mayor o igual que la de la columna para evitar la condensación de algún compuesto eluido.

En el análisis de las cantidades traza se utilizan por lo general detectores que presentan una elevada sensibilidad, buena estabilidad y reproducibilidad para determinadas sustancias, son los denominados detectores específicos como en NPD y ECD.

- ✓ **Detector de ionización de llama (FID)** en él se mide, registra y amplifica el flujo iónico resultante de la ionización de las moléculas en una llama de hidrógeno. El FID es un detector de los denominados universales o inespecíficos, especialmente adecuados para medidas cuantitativas. Es un detector dependiente del flujo de masa, es decir, la señal es tanto mayor, cuánta más sustancia se ioniza en la llama en la unidad de tiempo.
  
- ✓ **Detector de Conductividad Térmica** responde a cualquier soluto cuya conductividad térmica sea diferente a la del gas portador. Refiere la capacidad de una sustancia de transportar calor de una región caliente a una fría. El funcionamiento se basa en la disminución de la conductividad del gas portador cuando un soluto sale de la columna. Suele emplearse a aquellas especies que no producen respuesta del FID.

- ✓ **Nitrógeno/fósforo (NPD)** también llamado detector de llama alcalina es un detector de ionización de llama modificado que es especialmente sensible a compuestos que contienen nitrógeno y fósforo.

El nitrógeno es el gas carrier en el Detector NPD, pero el helio es usado especialmente cuando se encuentran instalados otros detectores adicionales al NPD en el cromatógrafo de gases.

El gas de salida de la columna nitrógeno o fosforo se mezcla con hidrógeno y se quema, este gas pasa alrededor y se pone en contacto con una esfera de rubidio  $Rb_2SO_4$  calentada eléctricamente hasta unos 600-800°C y mantenida a un potencial de 180 Voltios respecto al colector, alrededor de la cual se forma un plasma.

Mediante mecanismos se producen iones enlazados de Carbono-Nitrógeno y Carbono-Fósforo y al tener un medio conductor dicha diferencia de potencial permite la aparición de una pequeña corriente eléctrica amplificable y medible. Por lo general, la intensidad de la corriente será proporcional al número de iones formados, y por tanto a la cantidad de analito. (Figura 2.8)



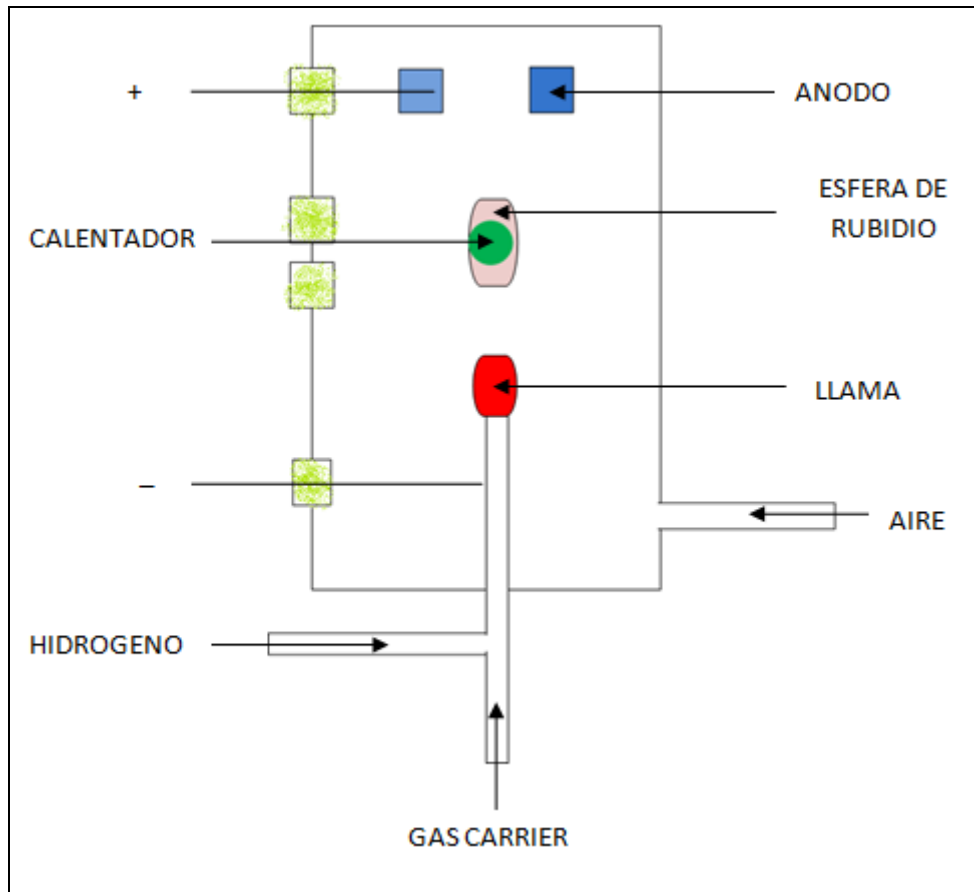


Figura 2.8. Esquema del detector nitrógeno fosforo

- ✓ **Detector de captura de Electrones (ECD)** posee la característica de detectar aquellas sustancias que poseen una elevada afinidad electrónica, mide una reducción de la señal en lugar de una amplificación.

El gas portador tiene que ser  $N_2$  o Ar con un 5% de metano. La humedad disminuye la sensibilidad.

El gas portador,  $N_2$  ó Ar, se hace pasar a través de una cámara que contiene un emisor de partículas  $\beta$  (Ni-63 o tritio adsorbido sobre una lámina de platino) de alta energía, las cuales, al interactuar con dicho gas portador producen grandes cantidades de electrones térmicos que se dirigen hacia un electrodo colector (por aplicación de

un voltaje entre 1 y 100 V), originándose una corriente uniforme o corriente-base.

Cuando moléculas del analito con alta afinidad electrónica entran al detector, capturan algunos electrones con lo que se produce una disminución de la corriente.

Por esta razón, los detectores son muy sensibles a los compuestos que contienen halógenos peróxidos, quinonas y grupos nitro, pero resultan insensibles a grupos funcionales como aminas, alcoholes e hidrocarburos.

Es el ideal para el análisis de muestras del ambiente, debido a que responde selectivamente a los compuestos orgánicos que contienen halógenos, como los pesticidas y policloruros de bifenilo.

La separación de los compuestos de una mezcla se realiza en las siguientes etapas:

1. Una vez elegida la columna y fase estacionaria, se ajustan las temperaturas de la cámara de inyección, columna y detector, así como el caudal de gas portador. Cuando la señal del detector es constante (sin ruidos la línea base) se hace la inyección de la muestra.
2. Las muestras se inyectan en cantidades inferiores a 1  $\mu\text{l}$ . cuando son líquidas y sobre 1 ml si son gaseosas; se introducen en la cámara de inyección, donde se vaporizan, y son arrastradas hasta la cabeza de la columna.

3. Los componentes se fijan en una pequeña zona de la columna; por equilibrios sucesivos entre fase móvil y estacionaria cada componente se desplaza por la columna a velocidades diferentes.
4. Finalmente, los solutos que salen de la columna, pasan al detector y se obtiene el cromatograma. (Figura 2.9)

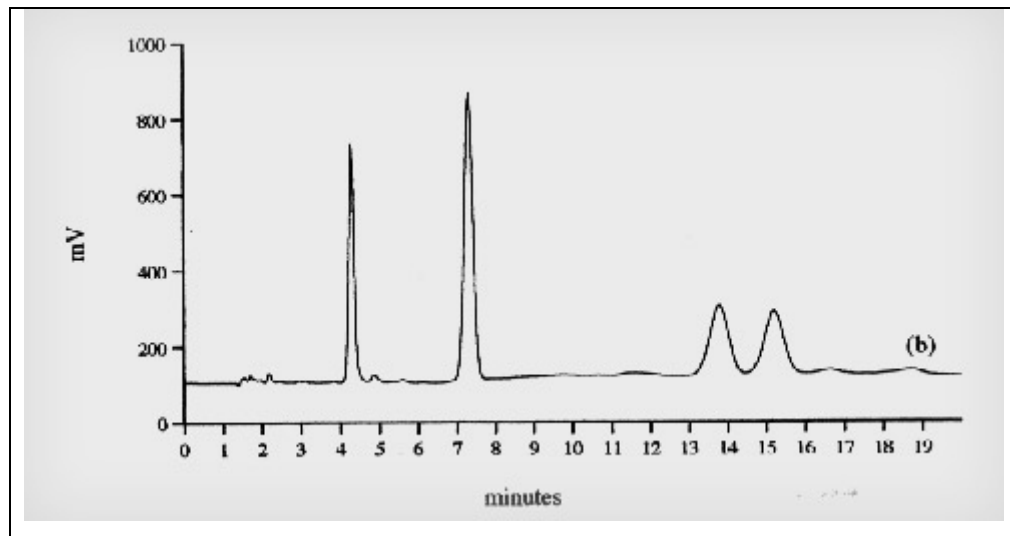


Figura 2.9. Cromatograma

## 2.8. Validación

Validación es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista.

Es el proceso de definir un requisito analítico y de confirmar que el método en consideración es apto para lo que requiere la aplicación.

Está implícito que los estudios para determinar los parámetros de aptitud del método se hacen usando equipamiento que funciona y que está calibrado correctamente, y cuando el o los operadores son competentes en el campo de trabajo.

Los métodos deberían validarse:

- Cuando se desarrolla un método nuevo
- Cuando se revisa un método ya establecido para mejorar o extender a un nuevo problema
- Cuando el control de calidad indica que el método en uso está cambiando con el tiempo.
- Cuando se usa un método ya establecido en un laboratorio diferente o con diferente analista o con diferente instrumental
- Para demostrar la equivalencia entre 2 métodos, por ej. Un método nuevo y una norma.

### **2.8.1. Importancia de validar un método**

- Cuando es importante determinar el resultado correcto y ser capaz de demostrar que es correcto
- Por la obligación profesional del analista ya que el cliente espera confiar en los resultados informados y tomar decisiones en base a los resultados analíticos.
- La toma de muestras, si el laboratorio no puede tomar la muestra o no tiene influencia sobre ello, los resultados deben informarse sobre la base de las muestras como fueron recibidas y destacar este hecho en el informe.

### **2.8.2. Aplicación**

La validación se aplica sobre todo, en el ámbito del proceso de diseño y desarrollo de un producto. Se realiza de acuerdo con lo planificado para asegurarse de que el producto resultante es capaz de satisfacer los requisitos para su aplicación especificada o uso previsto, cuando sea conocido.

Las actividades de validación añadirán información a las de verificación y serán el motor de la mejora de los procesos y productos, así como de las actividades de investigación y las necesidades futuras.

Para realizar el proceso de validación es necesario calcular una serie de parámetros descritos a continuación:

### 2.8.3. Parámetros:

De acuerdo al Manual de Control de Calidad del Laboratorio de Medio Ambiente donde se ubica el Instructivo de Validación encontramos las siguientes definiciones de los parámetros a determinar en el método analítico en estudio:

• **Función respuesta / linealidad:** Es la relación entre la concentración de analito y la respuesta del método. Esta relación, denominada comúnmente curva patrón o curva de calibración, no tiene por qué ser lineal para que el método sea eficaz. Cuando no sea posible la linealidad para un método, se deberá encontrar un algoritmo adecuado.

- Función de respuesta instrumental (del sistema de lectura) que es la que normalmente se conoce como recta de calibrado.

Se establece la función de respuesta  $[L = f(P)]$  con los pares de valores formados por las réplicas del Blanco (Bp) y de los patrones de trabajo limpios (P1, ..., P5) de valor teórico conocido, que cubran el intervalo de trabajo para el que se quiera desarrollar el método analítico.

Si los datos se ajustan a una recta (respuesta lineal), la ecuación de la función será del tipo:

$$L = mP + L_0 \quad (1)$$

Calculamos el coeficiente de regresión (m) de la misma y el coeficiente  $L_0$  (valor de la ordenada en el origen), por el método de los mínimos cuadrados.

Debemos estimar también el grado de ajuste de la recta estimada a los valores de L observados, calculando el grado de determinación,  $r_2$ , que no deberá superar unos valores prefijados, (por ejemplo deberá ser superior a 0.99), para considerar que la función es lineal en el intervalo de concentraciones de estudio además del error tipo en la estimación de P,  $s_{L,P}/m$ , la desviación tipo de m ( $s_m$ ) y la desviación tipo de  $L_0$  ( $s_{L_0}$ ), que necesitamos para determinar los respectivos intervalos de confianza.

Las ecuaciones que calculan sus desviaciones tipo son:

$$s_m = \frac{s_{L,P}}{\sqrt{\sum(P_i - \bar{P})^2}} \quad (2) \quad \text{y} \quad s_{L_0} = s_m \sqrt{\frac{\sum P_i^2}{n}} \quad (3)$$

donde:

$$s_{L,P} = \sqrt{\frac{\sum(L_{obs} - L_{est})^2}{n - 2}} \quad (4)$$

$L_{obs}$  son las lecturas observadas,

$L_{est}$  las estimadas con la recta de regresión  $L = mP + L_0$ ,

$n$  el número de pares de valores (=30 en el ejemplo) y

$P_i$  los valores asignados a los patrones.

Por otro lado, el error tipo en la estimación de P es

$$S_{P,L} = \frac{S_{L,P}}{m} \quad (5)$$

Si la función de respuesta no posee el grado de linealidad definido entonces se aumentará el número de Pi para descomponer la función de respuesta en tramos del intervalo de trabajo, o se investigará otra función matemática con el fin de establecer la curva que mejor se ajuste a los valores obtenidos y los niveles concretos en los que se pueden cuantificar las muestras en las condiciones de estudio.

- Función de respuesta del método: es la que se determina cuando se calcula la recuperación del método y puede coincidir exactamente con la instrumental cuando la recuperación es del 100%.
  
- **Incertidumbre de medida:** Estimación que caracteriza el intervalo de valores en el que se sitúa, generalmente con una alta probabilidad dada, el valor verdadero de la magnitud medida.
  - **Identificación de las fuentes de Incertidumbre:** Éstas provienen de los diversos factores involucrados en la medición, por ejemplo:
    - los resultados de la calibración del instrumento
    - la incertidumbre del patrón o del material de referencia
    - la repetibilidad de las lecturas
    - la reproducibilidad de las mediciones por cambio de observadores, instrumentos u otros elementos
    - características del propio instrumento, como resolución, deriva, etc.
    - variaciones de las condiciones ambientales.

- **Calculo de la Incertidumbre:** La incertidumbre de una magnitud de entrada  $X_i$  obtenida a partir de observaciones repetidas bajo condiciones de repetibilidad, se estima con base en la dispersión de los resultados individuales.

Si  $X_i$  se determina por  $n$  mediciones independientes, resultando en valores  $q_1, q_2, \dots, q_n$ , el mejor estimado  $x_i$  para el valor de  $X_i$  es la media de los resultados individuales:

$$x_i = \bar{q} = \frac{1}{n} \times \sum_{j=1}^n q_j \quad (6)$$

La dispersión de los resultados de la medición  $q_1, q_2, \dots, q_n$  para la magnitud de entrada  $X_i$  se expresa por su desviación estándar experimental:

$$s(q) = \sqrt{\frac{1}{n-1} \times \sum_{j=1}^n (q_j - \bar{q})^2} \quad (7)$$

La incertidumbre estándar  $u(x_i)$  de  $X_i$  se obtiene finalmente mediante el cálculo de la desviación estándar experimental de la media:

$$\mu(x_i) = s(\bar{q}) = \frac{s(q)}{\sqrt{n}} \quad (8)$$

Así que resulta para la incertidumbre estándar de  $X_i$ :



$$\mu(x_i) = \frac{1}{\sqrt{n}} \times \sqrt{\frac{1}{n-1} \times \sum_{k=1}^n (q_k - \bar{q})^2} \quad (9)$$

Es importante señalar que todas las componentes de la incertidumbre deben expresarse como incertidumbre estándar. En el caso de que la incertidumbre se determine experimentalmente, la incertidumbre estándar se obtiene calculando la desviación estándar de los replicados. Si se utiliza información previa, la incertidumbre estándar se suele obtener dividiendo por  $\sqrt{3}$  el intervalo proporcionado por el fabricante, esto dependerá del tipo de distribución de probabilidad que se vaya a utilizar.

- **Incertidumbre Expandida:** Para ello, debe multiplicarse la incertidumbre estándar por un factor de cobertura, k.

$$U = k \times u \quad (10)$$

Normalmente, k es igual a 2. De esta forma, se obtiene un intervalo donde existe aproximadamente un 95% de probabilidad de que se encuentre el valor verdadero con un número efectivo de grados de libertad de 1,96 de acuerdo a la t-Student.

- **Intervalo de trabajo:** El intervalo de trabajo de un método es el intervalo de concentración en el que puede obtenerse una exactitud y precisión adecuadas al objetivo del método.
- **Límite de cuantificación:** Concentración mínima de analito que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión. Se establece utilizando una muestra o material de referencia apropiado. Normalmente corresponde al punto inferior de la curva de calibración (excluido el blanco). No debe determinarse por extrapolación.

Es el valor, superior al LD, a partir del cual los resultados que se obtienen cumplen condiciones de precisión y de exactitud predeterminados por exigencias de norma, cliente, entre otros.

Si no existen estos condicionantes, el LC coincide con el LD.

Que sustituye a la ecuación  $LC = B + 10 S_B$  (11)

**LoC**= Límite de cuantificación

**B** = Media General

**Sb** = Desviación típica

- **Límite de detección:** Mínima concentración de analito que se puede detectar siguiendo el proceso completo del método con un nivel aceptable de confianza de que dicha concentración es mayor que el blanco.

El límite de detección (LD) se calcula a partir de los resultados obtenidos del blanco, convertidos a resultado final sobre muestra, según la ecuación:

$$LD = B + U_B$$

donde  $U_B$  es la incertidumbre expandida ( $k=2$  o el valor necesario que asegure una probabilidad de cobertura del 95%) asociada a la medida de  $B$  que es la media general, en condiciones de reproducibilidad, de los resultados de la submuestras de blanco convertida a resultado final sobre muestra.

Otra ecuación utilizada es  $LD = B + 3 S_B$  (12)

**LD**= Límite de detección

**B** = Media General

**S<sub>b</sub>**= Desviación típica

- **Exactitud:** La exactitud del método puede establecerse por la comparación de los resultados, obtenidos en el diseño experimental, de los Materiales de Referencia (MRi) con los valores teóricos de los mismos, observando el grado de concordancia entre el valor obtenido y el valor esperado.

La recuperación en cada punto se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{X_{\text{obtenido}}}{X_{\text{esperado}}} \times 100 \quad (13)$$

Donde:

$X_{\text{obtenido}}$  es el resultado obtenido del análisis del material de referencia utilizado, y

$X_{\text{esperado}}$  es el valor teórico del mismo.

La recuperación global del método se calcula a partir de la media de las individuales en cada punto (indicaremos el intervalo de recuperaciones obtenidas), cuando las recuperaciones en los diversos niveles son similares.

Si la recuperación no es similar en las distintas concentraciones del intervalo de trabajo y se observa que existe una posible relación entre la concentración y la recuperación, para la cuantificación de las muestras reales deberíamos recurrir al método de adiciones.

La presentación de los resultados finales sobre muestra (incluye su incertidumbre asociada) siempre deberán tener en cuenta el factor de recuperación. Este factor puede o no aplicarse. Si se aplica, la incertidumbre del resultado final deberá tener en cuenta la contribución de dicho factor. Si no se aplica, la incertidumbre del resultado final deberá tener en cuenta la contribución de no corregir.

Otras formas con las que puede determinarse la exactitud de un método, son:

- ❖ por comparación con resultados obtenidos por otro método ya validado
- ❖ mediante estudios de intercomparación.

- **Recuperación:** Procedimiento que establece el sesgo (o desviación del valor real) de un método de ensayo (lo que nos permite corregir los resultados obtenidos o modificar el método con el fin de mejorar el sesgo).
- **Repetibilidad:** Precisión bajo condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, con el mismo operador, utilizando el mismo instrumento de medida y durante un corto intervalo de tiempo.
- **Reproducibilidad:** Precisión bajo condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, sobre el mismo

mensurando, con diferentes operadores, diferentes equipos de medida, en diferentes laboratorios, etc.

La precisión de reproducibilidad que mide la siguiente  $S_R$  es la del método en el laboratorio.

El estudio de la precisión (repetibilidad y reproducibilidad) se puede realizar calculando, a través del análisis simple de varianza (ANOVA de dos factores totalmente anidados homogéneos), las desviaciones estándar de repetibilidad ( $S_r$ ) y de reproducibilidad ( $S_R$ ) para cada uno de los niveles de ensayo.

Tabla 2.8. Tabla para el análisis simple de la varianza

CADA NIVEL	Día				
	1	2	3	4	5
Observaciones					
1	$L_{11}$	$L_{21}$	$L_{31}$	$L_{41}$	$L_{51}$
2	$L_{12}$	$L_{22}$	$L_{32}$	$L_{42}$	$L_{52}$
3	$L_{13}$	$L_{23}$	$L_{33}$	$L_{43}$	$L_{53}$
4	$L_{14}$	$L_{24}$	$L_{34}$	$L_{44}$	$L_{54}$
5	$L_{15}$	$L_{25}$	$L_{35}$	$L_{45}$	$L_{55}$

$$\bar{L}_i = \frac{\sum_{j=1}^5 L_{ij}}{5}$$

Las medias de cada día están definidas por: (14)

$$\bar{L} = \frac{\sum_{i=1}^5 \sum_{j=1}^5 L_{ij}}{25} = \frac{\sum_{i=1}^5 5\bar{L}_i}{25} = \frac{\sum_{i=1}^5 \bar{L}_i}{5}$$

La media general es: (15)

Tabla 2.9. Análisis de varianza, ANOVA

Análisis simple de la varianza			
Origen de la varianza	Grados de libertad ( $\nu$ )	Sumas de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias (DCM = SDC/ $\nu$ ) (varianzas)
Entre grupos (Between)	$\nu_1 = 5-1=4$	$SDC_B = \sum_{i=1}^5 5(\bar{L}_i - \bar{L})^2$	$DCM_B = \frac{SDC_B}{4}$
Dentro del grupo (Within)	$\nu_2 = 25-5=20$	$SDC_W = \sum_{i=1}^5 \sum_{j=1}^5 (L_{ij} - \bar{L}_i)^2$	$DCM_W = \frac{SDC_W}{20}$
Total	$\nu = 25-1=24$ (= 4 + 20)	$SDC_T = \sum_{i=1}^5 \sum_{j=1}^5 (L_{ij} - \bar{L})^2$ (= $SDC_B + SDC_W$ )	$DCM_T = \frac{SDC_T}{24}$

La desviación estándar de repetibilidad ( $S_r$ ) es:  $s_r = \sqrt{DCM_W}$  (16)

La desviación estándar de reproducibilidad ( $S_R$ ) es:  $s_R = \sqrt{s_r^2 + s_L^2}$  (17)

Donde:

$$s_L^2 = \frac{DCM_B - DCM_W}{5}, (18)$$

Siendo el denominador (5) igual al número de observaciones que se realizan cada día, en cada nivel.

Si, por efectos aleatorios,  $s_L^2 < 0$ , debe asumirse  $s_L^2=0$ , normalmente debería cumplirse que  $DCM_B > DCM_W$  y en caso contrario deberían existir razones que lo justificaran.

Las  $S_r$  y  $S_R$  del método estarán comprendidos entre el valor menor y el valor mayor de todas las desviaciones típicas calculadas.

- **Selectividad / especificidad:** Grado por el cual un método puede determinar un analito particular dentro de una mezcla compleja, sin ser interferido por otros componentes de la mezcla.

#### 2.8.4. Distribuciones de probabilidad

La cuantificación de una fuente de incertidumbre incluye la asignación de un valor y la determinación de la distribución a la cual se refiere este valor.

- **Distribución normal:** Los resultados de una medición repetida afectada por una o más magnitudes de influencia que varían aleatoriamente, generalmente siguen en buena aproximación una distribución normal. También la incertidumbre indicada en certificados de calibración se refiere generalmente a una distribución normal.

La desviación estándar experimental de la media calculada a partir de los resultados de una medición repetida según la ecuación (19) ya representa la incertidumbre estándar.

$$u(X_i) = \frac{1}{\sqrt{n}} \times \sqrt{\frac{1}{n-1} \times \sum_{k=1}^n (q_k - \bar{q})^2} \quad (19)$$

Cuando se dispone de valores de una incertidumbre expandida  $U$ , como los presentados por ejemplo en certificados de calibración, se divide  $U$  entre el factor de cobertura  $k$ , obtenido ya sea directamente o a partir de un nivel de confianza dado.

$$u(X_i) = \frac{U}{k} \quad (20)$$

- **Distribución rectangular:** En una distribución rectangular cada valor en un intervalo dado tiene la misma probabilidad, o sea la función de densidad de probabilidad es constante en este intervalo.

Ejemplos típicos son la resolución de un instrumento digital o la información técnica sobre tolerancias de un instrumento. En general, cuando exclusivamente hay conocimiento de los límites superior e inferior del intervalo de variabilidad de la magnitud de entrada, lo más conservador es suponer una distribución rectangular.

Si la magnitud de entrada  $X_i$  tiene una distribución rectangular con el límite superior  $a_+$  y el límite inferior  $a_-$ , el mejor estimado para el valor de  $X_i$  está dado por:

$$X_i = \frac{a_+ + a_-}{2} \quad (21)$$

y la incertidumbre estándar se calcula por

$$u(X_i) = \frac{a_+ + a_-}{\sqrt{12}} \quad (22)$$

o por

$$u(X_i) = \frac{a/2}{\sqrt{3}} \quad (23)$$

donde  $a/2$  es el semiancho del intervalo  $a$  con

$$a = a_+ - a_- \quad (24)$$



Es importante señalar que todas las componentes de incertidumbre deben expresarse como **incertidumbre estándar**. En el caso de que la incertidumbre se determine experimentalmente, la incertidumbre estándar se obtiene calculando la desviación estándar de los replicados. Si se utiliza información previa, la incertidumbre estándar se suele obtener dividiendo por  $\sqrt{3}$  el intervalo proporcionado por el fabricante (con lo que se asume que el intervalo de confianza sigue una distribución rectangular).<sup>6</sup>

- **Distribución triangular:** Si además del conocimiento del límite superior e inferior hay evidencia de que la probabilidad es más alta para valores en el centro del intervalo y se reduce hacia los límites, puede ser más adecuado basar la estimación de la incertidumbre en una distribución triangular.

Antes de comparar y combinar contribuciones de la incertidumbre que tienen distribuciones diferentes, es necesario representar los valores de las incertidumbres originales como incertidumbres estándar. Para ello se determina la desviación estándar de la distribución asignada a cada fuente.

Como en una distribución rectangular, para una magnitud de entrada  $X_i$  que tiene una distribución triangular con los límites  $a_+$  y  $a_-$ , el mejor estimado para el valor de  $X_i$  está dado por:

$$X_i = \frac{a_+ + a_-}{2} \quad (25)$$

---

<sup>6</sup> Maroto, A., Boqué, R., Riu, J., Rius, F., Estrategias para el Cálculo e La Incertidumbre, Instituto de Estudios Avanzados. Universitat Rovira i Virgili, Departamento de Química Analítica y Química Orgánica.

La incertidumbre estándar se calcula en este caso por:

$$u(X_i) = \frac{a_+ + a_-}{\sqrt{24}} = \frac{a/2}{\sqrt{6}} \quad (26)$$

con  $a$  definido por la ecuación (24).

#### **2.8.5. Grados de libertad**

Es un estimador del número de categorías independientes en una prueba particular o experimento estadístico. Se encuentran mediante la fórmula  $n - r$ , donde  $n$  = número de sujetos en la muestra y  $r$  es el número de sujetos o grupos estadísticamente dependientes ligados a las observaciones.

## **CAPITULO III**

### **PROCEDIMIENTO**

El procedimiento a seguir tuvo como fundamento y base referencial la metodología desarrollada en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Comisión Ecuatoriana de Energía Atómica, CEEA. Este método se basa en una extracción con diclorometano, acetona y hexano, purificación con centrifugación y su posterior inyección en sistema GC-NPD. La recuperación consiste en aplicar a propósito cantidades y concentraciones conocidas de los plaguicidas en estudio a una muestra de banano, para luego realizar el procedimiento completo.

Para el caso de este proyecto de tesis se redactó que se aplican a las condiciones de trabajo del LMA y quedó plasmado en el procedimiento técnico PTI-01-GC Determinación de Pesticidas Organofosforados en Banano (*Musa Sapientum*) Mediante Cromatografía de Gases, el mismo que fue entregado al LMA.

A continuación se detallan modificaciones en los volúmenes de los solventes así como también el uso de diferentes solventes.

#### **5.1. Aplicación**

El rango de concentración de pesticidas organofosforados en la muestra a la que se aplica el método es de 0.03ppm para el Ethoprophos.

## 5.2. Parámetros a determinar

Debido a la disponibilidad de estándares de referencia y la técnica a emplearse, los siguientes pesticidas organofosforados son los que se determinarán. (Tabla 3.1)

**Tabla 3.1: Pesticidas Organofosforados Seleccionados para el Análisis.**

PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS	INTERVALOS DE TRABAJO	BASADO EN EL MÉTODO DE ENSAYO
Dichlorvos (DDVP)	0,6 a 14 mg/Kg	Comisión Ecuatoriana de Energía Atómica CEEA
Mevinphos (Phosdrin)		
Ethoprophos		
Methyl Paraoxon (Parathion)		
Chlorpyrifos (Dursban)		
Stirofos (Tetrachlorvinphos)		
Disulfoton Sulfon		

## 3.3. Muestras

El procedimiento se aplica a muestras de banano, las mismas que deben ser recolectadas al azar en diferentes clústers, estas serán cubiertas con papel aluminio, el tamaño mínimo necesario es de 1Kg (Tabla 2.5.), del cual se tomará 30 gr. para el análisis cromatográfico.

### 3.3.1. Selección de la muestra o muestreo

No se realiza ninguna distinción para escoger el sitio de donde se tomaran las muestras

## 3.4. Interferencias en el método

### 3.4.1. Interferencias

Las interferencias pueden ser pigmentos, proteínas, azúcares y ácidos grasos que obstaculizan la detección de pesticidas a niveles de trazas, se eliminan mediante el proceso de clean-up, para el caso del banano se lo realiza mediante filtración con sulfato de sodio anhidro.

Se debe evitar interferencias como contaminantes en disolventes, reactivos, cristalería y otros aparatos de procesamiento de muestra que conducen a líneas de base elevadas en cromatogramas por contaminación en el sistema de cromatografía gaseosa.

Por tanto, todos los reactivos y aparatos deberán comprobarse rutinariamente estar libres de impurezas y listos para contribuir con el análisis cromatográfico.

#### **3.4.2. Condiciones de trabajo**

- Sala exclusiva para instrumental
- Evitar la presencia de insecticidas de pulverización, perfumes, cosméticos en el ambiente de trabajo.
- Todo material de vidrio debe estar perfectamente limpio (INSTRUCTIVO DE LIMPIEZA DE MATERIAL DE VIDRIO) y de uso exclusivo para el análisis de residuos

#### **5.5. Equipos de laboratorio**

- Cromatógrafo de gas (GC), Marca Perkin-Elmer, Modelo Clarus 500 que incluye:
  - Touch Screen
  - Control electrónico de presión (PPC)
  - Sistema de detección nitrógeno/fósforo (NPD)
  - Automuestreador
  - Inyector de columnas capilares con control electrónico de presión split/splitless
  - Software TotalChrom Navigator

- Computadora DELL e impresora Help Desk (Ordenador) (Figura 3.1)



**Figura 3.1. Cromatógrafo de Gases, Ordenador**

- Rotavapor BUCHI R-210 con temperaturas de hasta 180°C (Figura 3.2)



**Figura 3.2. Rotavapor BUCHI R-210**

- Balanza analítica de apreciación: 0,1 mg. (Figura 3.3)



**Figura 3.3. Balanza Analítica**

- Centrifuga Hettich (Figura 3.4)



**Figura 3.4. Centrifuga HETTICH**

- Estufa con control de temperatura (Figura 3.5)



**Figura 3.5. Estufa**

- Licuadora marca OSTER 10 velocidades (Figura 3.6)



**Figura 3. 6. Licuadora Oster**



- Bombona de gas Helio y manómetro
- Bombona de gas Nitrógeno y manómetro
- Bombona de gas Aire y manómetro
- Generador de Hidrógeno, Marca Perkin Elmer

## 5.6. Materiales

- Pipetas automáticas de volumen variable (100µl a 1ml)
- Matraces aforados de 50, 100, 250 ml.
- Vasos de precipitación de 50, 100, 250 ml.
- Balones de 10, 25, 50 ml. con tapas
- Papel filtro cualitativo Whatman 125mm diámetro
- Embudos de vidrio de 60°
- Tubos de ensayo
- Probetas de vidrio de 10 y 25 ml.
- Varillas de agitación
- Viales para cromatografía color ámbar de 2 ml.
- Cuchillo con mango de plástico negro

## 5.7. Reactivos y estándares

### 5.7.1. Reactivos

- ❖ Acetona grado pesticida ( $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$ ), al 99.99% de pureza.
- ❖ Diclorometano grado pesticida ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), al 99.99% de pureza
- ❖ n-Hexano grado pesticida. ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ), al 99.99% de pureza
- ❖ Sulfato de sodio granular y anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), grado analítico.

### 5.7.2. Estándares (materiales de referencia)

Estándar RESTEK, Mix de pesticidas organofosforados con concentración de 500ppm. (Tabla 3.2)

**Tabla 3.2. Mix de Pesticidas Organofosforados, Concentración e Incertidumbre**

COMPUESTO	CONCENTRACION ( $\mu\text{g/ml}$ )	% INCERTIDUMBRE (95%) C.L. ; K=2
Dichlorvos(DDVP)	501.760	+/- 0.67%
Mevinphos(Phosdrin)	500.000	+/- 0.67%
Ethoprophos	499.800	+/- 0.67%
Methyl Paraoxon(Parathion)	502.000	+/- 0.67%
Chlorpyrifos(Dursban)	500.000	+/- 0.67%
Stirofos(Tetrachlorvinphos)	504.960	+/- 0.67%
Disulfoton Sulfon	502.000	+/- 0.67%

### 3.8. Soluciones

Las siguientes soluciones fueron realizadas mediante el uso de una micro pipeta (rango 10 a 1000  $\mu\text{L}$ .) en unidades de volumen.

- Soluciones para calibración del equipo
  - Solución de Estándar Mix de Pesticidas Fosforados de 500 ppm a 20 ppm.
    - Tomar 0.4 mL. del Estándar de 500 ppm y aforar en un balón de 10 mL. con una mezcla de hexano-diclorometano en relación 1:1
  - Solución de Estándar mix de pesticidas órgano fosforados de 500 ppm a 10 ppm
    - Tomar 0.5 mL. del estándar de 500 ppm y aforar en un balón de 25 mL. con una mezcla de hexano-diclorometano en relación 1:1.

- Solución de 10 ppm a 1 ppm
  - Tomar 1 mL. de la solución de 10 ppm y aforar en un balón de 10 mL. con una mezcla hexano-diclorometano en relación 1:1.
  
- Solución de 1 ppm a 0,6 ppm
  - Tomar 0.6 mL. de la solución de 1 ppm y aforar en un vial de color ámbar a 1 mL. con una mezcla hexano-diclorometano en relación 1:1.
  
- Solución de 1 ppm a 1 ppm
  - Tomar 1 mL. de la disolución de 1 ppm y colocar en un vial de color ámbar.
  
- Solución de 10 ppm a 10 ppm
  - De la solución de 10 ppm se tomo 1 mL. para colocar en un vial de color ámbar
  
- Solución de 20 ppm a 14 ppm
  - Tomar 0,7mL. de la solución del 20 ppm y aforar en un vial de color ámbar a 1 mL. Con una mezcla hexano-diclorometano en relación 1:1.

- Muestras para la validación del método
  - Muestra de 0,03ppm
    - De la solución de 1ppm tomar 1mL. para posteriormente colocarla en la muestra de banano y así tener 0,03ppm de pesticidas organofosforados y realizar el protocolo de análisis.

### **3.9. Protocolo de análisis**

En el procedimiento analítico para la determinación de pesticidas organofosforados se diferencian las siguientes etapas:

1. Recolección de la muestra
2. Preparación de la muestra
3. Proceso de extracción
4. Proceso de limpieza o clean-up
5. Proceso de concentrado
6. Almacenamiento
7. Cuantificación mediante Cromatografía Gaseosa
8. Validación del método analítico

#### **5.9.1. Recolección de la muestra**

El banano debe ser recolectado al azar en diferentes clústers, cubiertos con papel aluminio y etiquetados adecuadamente.

#### **5.9.2. Preparación de la muestra**

Los bananos se deben cortar con cascara y picar en trozos de menor tamaño, hasta obtener una mezcla homogénea con consistencia de papilla,

seguido se pesara 30 gr. en recipientes de vidrio (pírex) en una balanza analítica. (Figura 3.7)



**Figura 3.7. Homogenización y Pesaje de la Muestra**

Las muestras que no se analicen en ese momento, se almacenaran en refrigeración a 4°C hasta su extracción en envases de vidrio (pírex). El tiempo de almacenamiento no debe ser mayor a 48 horas.

### **5.9.3. Proceso de extracción**

- Colocar 30gr. de banano en el vaso de la licuadora añadiendo 1 ml. del estándar de control de 1ppm, en el proceso de preparación de la muestra, agregar 30 ml. de acetona, el 50% del volumen indicado en el método base, licuar por 5 min. (Tabla 5.24)
- Preparar de la misma manera una segunda muestra colocando el estándar de control antes del proceso de filtración (Tabla 5.25) y una tercera muestra antes del proceso de evaporación (Tabla 5.26).

- Adicional se debe preparar una muestra siguiendo el mismo procedimiento sin colocar el estándar de control, muestra sin fortificar. (Figura 3.8)



**Figura 3.8. Adición del Estándar de Control**

- Añadir 15 ml. de diclorometano y 15 ml. de hexano, la mitad del volumen indicado en el método CEEA, volver a agitar en la licuadora hasta que la mezcla presente una característica homogénea. (Figura 3.9)



**Figura 3.9. Adición de Solventes**

- Recoger la parte semi-sólida en un tubo de centrifuga, centrifugar por 3 min. para separar en el extracto y el sólido. (Figura 3.10)



**Figura 3.10. Centrifugación**

**Nota:** De la misma manera se trabaja con solvente tolueno a cambio de diclorometano siguiendo los mismos pasos del proceso de extracción (Tabla 5.27).

#### 5.9.4. Proceso de limpieza o clean - up

- Colocar sulfato anhidro  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para su purificación.
- Filtrar el extracto a través  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  purificado usando un embudo de vidrio de 60°.
- Pasar la fase orgánica que se separó de la masa semi-sólida aforando en el balón de 100 ml. y aforar dando un enjuague final con 2ml de mezcla en relación 1:1 de diclorometano-hexano. (Figura 3.11)

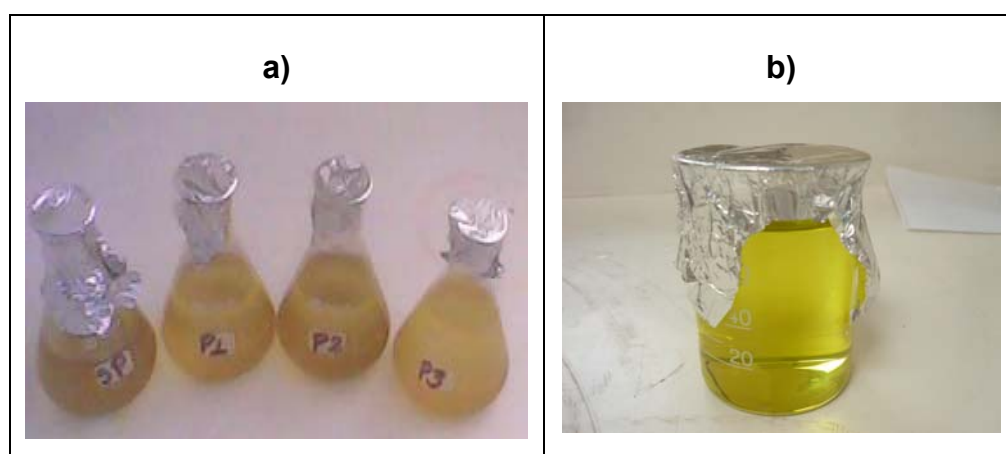
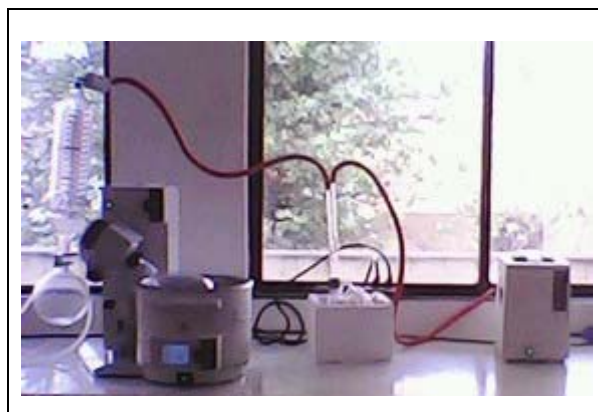


Figura 3.11. a) Extracto sin filtración b) Extracto Filtrado



### 5.9.5. Proceso de concentrado

- Evaporar el extracto a 1 ml. en rotavapor a una temperatura de 39-40 °C. (Figura 3.12)



**Figura 3.12. Concentrado**

- Colocar el 1ml en un vial para cromatografía de color ámbar y realizar el análisis cromatográfico. (Figura 3.13)



**Figura 3.13. Extracto Final**

**Nota:** después de cada paso como requerimiento se deberá enjuagar con 2ml. de hexano-diclorometano en relación 1:1 con el objetivo de no perder parte de la muestra fortificada en todo el proceso.

#### **5.9.6. Almacenamiento**

- El almacenamiento de las muestras se lo debe realizar en pírrex refrigerados a 4°C hasta su extracción por un tiempo no mayor a 4 horas.
- El almacenamiento de los extractos debe ser a refrigeración a –20°C de forma inmediata por un máximo de 7 días.
- Los extractos y las soluciones de ensayos finales no deben ser expuestos al calor ni a la luz solar.
- Aquellas que solo hayan pasado por el proceso de preparación de la muestra y que no sean analizadas se guardarán en envases de vidrio y se almacenaron en refrigeración (4°C) hasta su extracción. El tiempo de almacenamiento no debe ser mayor a 48 horas.

**Nota:** Para mayor detalle se debe revisar el Procedimiento Técnico PTI-01-GC que se encuentra dentro de los documentos de control de calidad del LMA.

### 5.9.7. Cuantificación mediante cromatografía gaseosa

- Los pesticidas fosforados serán cuantificados mediante cromatografía gaseosa con detector Nitrógeno Fósforo NPD.
- El uso y manejo del equipo se describen en el instructivo correspondiente (INSTRUCTIVO DE USO Y MANEJO DE EQUIPO CROMATOGRFO DE GASES).
- La calibración del Cromatógrafo de Gases se realiza con las soluciones de concentración de 0,6 ppm, 1 ppm, 10 ppm y 14 ppm.
- Las condiciones instrumentales para la cuantificación de pesticidas órgano fosforados en las muestras de banano se recogen en la siguiente tabla 3.3.
- Los pesticidas órgano fosforados son identificados en un cromatograma que presenta a cada uno de ellos con sus respectivos nombres, tiempo de retención, área y altura. (Figura 3.14)

**Tabla 3.3. Condiciones Cromatográficas Establecidas para Pesticidas Organofosforados**

<b>Detector:</b>	Nitrógeno/Fosforo NPD 260°C		
<b>Inyector:</b>	Automático de líquidos. Split a 250°C		
<b>Columna:</b>	Capilar N9316023 Phase: Elite 1 Dimensiones: Longitud: 30 m. Diámetro Interno: 0,32mm Rango de Temperatura: -60 a 330/350°C		
<b>Rampa del Horno:</b>	<b>RATE</b>	<b>TEMPERATURE °C</b>	<b>HOLD</b>
<b>Inicial</b>	0,00	50	0,00
1	4,00	250	10,00
2	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00

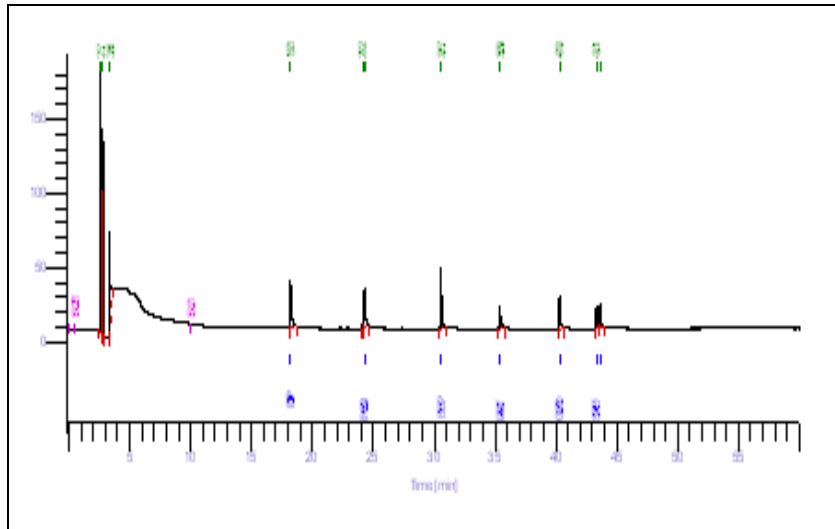


Figura 3.14. Cromatograma Organofosforados

### 3.10. Cálculos

Para la determinación de la concentración individual de cada compuesto en la muestra aplicar la siguiente fórmula:

$$C = \frac{A(\text{mg} / \text{L}) - B(\text{mg} / \text{L})}{1000 \times m(\text{Kg})} \quad (27)$$

**C = Concentración (mg/Kg)**

**A = Concentración del Extracto**

**B = Blanco**

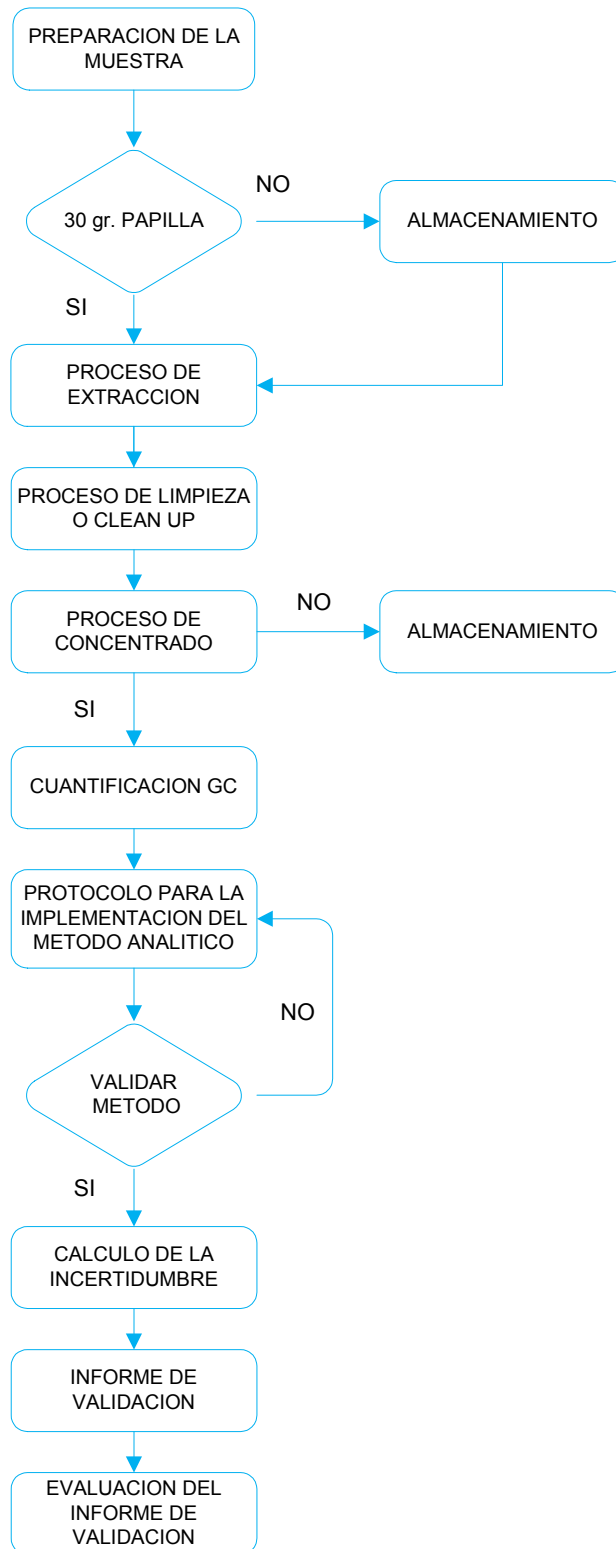
**m = Masa**

Los resultados serán expresados en mg/Kg

### **3.11. Validación del método analítico**

- Preparación de muestras de banano de concentración de 0,03ppm para validación del método detalladas en el ítem 3.8
  
- Preparación del extracto de la solución indicada y un blanco de acuerdo a los ítems 3.8.1 a 3.8.5
  
- Cuantificación (ítem 3.8.7): Se realizaran mediciones en 3 días con inyección de 1  $\mu$ L cada uno.
  
- Determinación y Cálculo de Parámetros estadísticos para la validación del método analítico.
  - Límites de Detección/Cuantificación
  - Repetibilidad /Reproducibilidad
  - Incertidumbre
  - Porcentaje de Recuperación

### 3.12. Esquema del proceso



## CAPÍTULO IV

### DATOS EXPERIMENTALES

#### 4.1. Blancos

En la tabla 4.1, 4.2 y 4.3 se detallan los blancos, es decir muestras de banano a las que no se les ha añadido el mix de pesticidas organofosforados, en ellas se encuentran datos de tiempo, área y altura.

Los blancos corrieron tres veces por tres días diferentes.

Tabla 4.1. Datos de Tiempo, Altura y Área del Blanco, día 1

DIA 1					
	CORRIDA	TIEMPO (min)	HEIGHT (uV)	AREA (uV*s)	
DDVP					
	1	18,607	0,000	0,000	
	2	18,598	0,000	0,000	
	3	18,600	0,000	0,000	
PHOSDRIN		<b>SIN FORTIFICAR</b>			
		<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV)</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	24,770	0,000	0,000	
	2	24,760	0,000	0,000	
	3	24,754	0,000	0,000	
ETHOPROPOS		<b>SIN FORTIFICAR</b>			
		<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV)</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	30,667	919,620	5382,180	
	2	30,692	792,180	4547,680	
	3	30,701	733,370	4160,180	
PARATHION		<b>SIN FORTIFICAR</b>			
		<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV)</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	35,306	1320,610	7845,120	

	2	35,329	1281,700	7914,560
	3	35,345	1181,170	7438,980
<b>CLORPHIRIFOS</b>		<b>SIN FORTIFICAR</b>		
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV)</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	40,419	5466,330	34726,160
	2	40,447	5124,150	32693,480
	3	40,459	4267,980	26692,040
<b>STIROFOS</b>		<b>SIN FORTIFICAR</b>		
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV)</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	44,352	0,000	0,000
	2	44,353	0,000	0,000
	3	44,355	0,000	0,000
<b>DISULFOTON</b>		<b>SIN FORTIFICAR</b>		
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV)</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	44,558	0,000	0,000
	2	44,550	0,000	0,000
	3	44,550	0,000	0,000

**Tabla 4.2. Datos de Tiempo, Altura y Área del Blanco, día 2**

<b>DIA 2</b>				
<b>DDVP</b>	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV)</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	18,765	5759,150	48504,370
	2	18,782	3895,890	32646,540
	3	18,771	0,000	0,000
<b>PHOSDRIN</b>		<b>SIN FORTIFICAR</b>		
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV)</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	24,745	0,000	0,000
	2	24,744	0,000	0,000
	3	24,749	0,000	0,000
<b>ETHOPROPOS</b>		<b>SIN FORTIFICAR</b>		
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV)</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	31,172	0,000	0,000
	2	31,175	0,000	0,000
	3	31,176	0,000	0,000



<b>PARATHION</b>		<b>SIN FORTIFICAR</b>		
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV)</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	36,330	0,000	0,000
	2	36,324	0,000	0,000
<b>CLORPHIRIFOS</b>		<b>SIN FORTIFICAR</b>		
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV)</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	41,003	1827,350	12544,660
	2	41,038	1293,700	8789,710
<b>STIROFOS</b>		<b>SIN FORTIFICAR</b>		
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV)</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	44,5080	0,000	0,000
	2	44,5170	0,000	0,000
<b>DISULFOTON</b>		<b>SIN FORTIFICAR</b>		
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV)</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	44,7310	2105,180	21830,850
	2	44,7220	2199,400	23657,690
<b>STIROFOS</b>		<b>SIN FORTIFICAR</b>		
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV)</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	3	44,5370	0,000	0,000
	3	44,7470	0,000	0,000

Tabla 4.3. Datos de Tiempo, Altura y Área del Blanco, día 3

<b>DIA 3</b>				
<b>DDVP</b>	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV)</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	18,7140	0,000	0,000
	2	18,7360	0,000	0,000
	3	18,7520	0,000	0,000
<b>PHOSDRIN</b>		<b>SIN FORTIFICAR</b>		
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV)</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	24,8830	0,000	0,000
	2	24,9070	0,000	0,000
<b>ETHOPROPOS</b>		<b>SIN FORTIFICAR</b>		

	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV)</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	31,3330	0,000	0,000
	2	31,3570	0,000	0,000
	3	31,3820	0,000	0,000
<b>PARATHION</b>		<b>SIN FORTIFICAR</b>		
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV)</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	36,5280	0,000	0,000
	2	36,5530	0,000	0,000
	3	36,5760	0,000	0,000
<b>CLORPHIRIFOS</b>		<b>SIN FORTIFICAR</b>		
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV)</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	41,4200	0,000	0,000
	2	41,4470	0,000	0,000
	3	41,4690	0,000	0,000
<b>STIROFOS</b>		<b>SIN FORTIFICAR</b>		
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV)</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	44,6190	0,000	0,000
	2	44,6580	0,000	0,000
	3	44,6870	0,000	0,000
<b>DISULFOTON</b>		<b>SIN FORTIFICAR</b>		
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV)</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	44,9250	0,000	0,000
	2	44,9420	0,000	0,000
	3	44,9700	0,000	0,000

## 4.2. Estándares

En las Tablas 4.4., 4.5, 4.6 y 4.7 se detallan valores de área, altura y tiempo de cada estándar de la curva de calibración.

Se realizo tres mediciones

**Tabla 4.4. Datos de Tiempo, Altura y Área del Estándar de 0,6 ppm**

	<b>ESTÁNDAR 0,6 PPM</b>			
	<b>DIA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
<b>DDVP</b>	1	18,568	6375,230	58482,020
	2	18,665	5051,770	45914,580
	3	18,743	4350,190	43648,980
	<b>ESTÁNDAR 0,6 PPM</b>			
<b>PHOSDRIN</b>	<b>DIA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	24,715	5306,410	50437,460
	2	24,827	4217,610	33040,060
	3	24,917	4002,280	36506,310
	<b>ESTÁNDAR 0,6 PPM</b>			
<b>ETHOPROPOS</b>	<b>DIA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	31,120	9037,870	69246,030
	2	31,263	6864,200	53585,620
	3	31,375	5933,180	49907,890
	<b>ESTÁNDAR 0,6 PPM</b>			
<b>PARATHION</b>	<b>DIA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	36,240	2701,470	26298,370
	2	36,424	1837,030	18062,780
	3	36,589	1465,480	14990,840
	<b>ESTÁNDAR 0,6 PPM</b>			
<b>CLORPHIRIFOS</b>	<b>DIA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	41,116	3714,890	28591,220
	2	41,305	2159,960	17390,270
	3	41,472	1917,210	16290,300
<b>STIROFOS</b>	<b>ESTÁNDAR 0,6 PPM</b>			

	DIA	TIEMPO (min)	HEIGHT (uV )	AREA (uV*s)
	1	44,241	1810,160	16087,080
	2	44,474	1331,600	11313,210
	3	44,768	1158,990	8917,730
<b>DISULFOTON</b>	<b>ESTÁNDAR 0,6 PPM</b>			
	DIA	TIEMPO (min)	HEIGHT (uV )	AREA (uV*s)
	1	44,455	2007,140	20166,720
	2	44,660	1539,840	14447,900
	3	44,804	1584,500	16380,610

**Tabla 4.5. Datos de Tiempo, Altura y Área del Estándar de 1 ppm**

	<b>ESTÁNDAR 1 PPM</b>			
	DIA	TIEMPO (min)	HEIGHT (uV )	AREA (uV*s)
<b>DDVP</b>	1	18,589	99931,650	1035272,200
	2	18,681	74638,580	841949,000
	3	18,771	74572,650	909537,700
	<b>ESTÁNDAR 1 PPM</b>			
<b>PHOSDRIN</b>	DIA	TIEMPO (min)	HEIGHT (uV )	AREA (uV*s)
	1	24,745	76752,420	778028,260
	2	24,845	64651,560	708800,360
	3	24,941	65646,550	752598,500
<b>ETHOPROPOS</b>	<b>ESTÁNDAR 1 PPM</b>			
	DIA	TIEMPO (min)	HEIGHT (uV )	AREA (uV*s)
	1	31,158	112491,020	1023351,110
	2	31,291	91598,670	836856,600
<b>PARATHION</b>	<b>ESTÁNDAR 1 PPM</b>			
	DIA	TIEMPO (min)	HEIGHT (uV )	AREA (uV*s)
	1	36,284	41471,990	461842,020
	2	36,460	35384,830	416121,280
	3	36,625	33754,300	429630,360
<b>CLORPHIRIFOS</b>	<b>ESTÁNDAR 1 PPM</b>			
	DIA	TIEMPO (min)	HEIGHT (uV )	AREA (uV*s)
	1	41,169	55235,150	519157,720
	2	41,340	47063,830	469513,240

	3	41,513	43066,760	482843,570
<b>STIROFOS</b>	<b>ESTÁNDAR 1 PPM</b>			
	<b>DIA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	44,317	32564,530	297763,060
	2	44,514	30101,300	240413,470
	3	44,704	27330,830	238704,380
<b>DISULFOTON</b>	<b>ESTÁNDAR 1 PPM</b>			
	<b>DIA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	44,518	39188,410	410237,190
	2	44,692	36078,090	401079,910
	3	44,863	34628,900	413507,250

**Tabla 4.6. Datos de Tiempo, Altura y Área del Estándar de 10 ppm**

<b>DDVP</b>	<b>ESTÁNDAR 10 PPM</b>			
	<b>DIA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	18,537	956346,340	24255003,890
	2	18,644	970709,790	19947372,600
	3	18,761	969985,740	16041806,350
<b>PHOSDRIN</b>	<b>ESTÁNDAR 10 PPM</b>			
	<b>DIA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	24,697	933879,330	18843319,500
	2	24,817	964589,110	17175130,090
	3	24,932	891251,220	12889646,940
<b>ETHOPROPOS</b>	<b>ESTÁNDAR 10 PPM</b>			
	<b>DIA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	31,1170	953989,8300	15791836,6700
	2	31,2570	965960,7000	14488930,3900
	3	31,3810	971582,7000	12086816,2500
<b>PARATHION</b>	<b>ESTÁNDAR 10 PPM</b>			
	<b>DIA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	36,299	795752,390	10306680,070
	2	36,479	651306,840	8842031,560
	3	36,614	494363,420	6943923,840
<b>CLORPHIRIFOS</b>	<b>ESTÁNDAR 10 PPM</b>			
	<b>DIA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	41,157	958401,900	13797036,700

	2	41,357	967572,680	12307499,710
	3	41,519	761984,930	9566306,210
<b>STIROFOS</b>	<b>ESTÁNDAR 10 PPM</b>			
	<b>DIA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	44,349	720598,320	6812723,320
	2	44,554	624478,070	6029731,640
	3	44,706	506763,950	4705915,030
<b>DISULFOTON</b>	<b>ESTÁNDAR 10 PPM</b>			
	<b>DIA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	44,541	916670,450	12920916,270
	2	44,722	792179,340	11373940,660
	3	44,866	616417,450	8618753,880

Tabla 4.7. Datos de Tiempo, Altura y Área del Estándar de 14 ppm

<b>DDVP</b>	<b>ESTÁNDAR 14 PPM</b>			
	<b>DIA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	18,491	968853,310	32011816,990
	2	18,588	972006,360	28984193,010
	3	18,668	975191,930	28593916,170
<b>PHOSDRIN</b>	<b>ESTÁNDAR 14 PPM</b>			
	<b>DIA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	24,657	948631,920	27276079,220
	2	24,761	959942,620	24360098,030
	3	24,855	964804,060	24704278,040
<b>ETHOPROPOS</b>	<b>ESTÁNDAR 14 PPM</b>			
	<b>DIA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	31,0970	951041,6100	20614143,0900
	2	31,2280	961973,2500	19279549,7000
	3	31,3410	963583,1900	19888899,0500
<b>PARATHION</b>	<b>ESTÁNDAR 14 PPM</b>			
	<b>DIA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	36,2440	949958,9900	17092385,6600
	2	36,4210	957223,4000	16620641,0800
	3	36,5750	957847,7300	17557760,6300
<b>CLORPHIRIFOS</b>	<b>ESTÁNDAR 14 PPM</b>			
	<b>DIA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>

	1	41,1370	954469,1900	18489504,9900
	2	41,3150	969178,1200	18276863,4900
	3	41,4680	961070,6800	19085844,2700
<b>STIROFOS</b>	<b>ESTÁNDAR 14 PPM</b>			
	<b>DIA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	44,317	945655,990	30601181,890
	2	44,501	951898,390	30077185,790
	3	44,675	953242,850	30291997,110

### 4.3. Muestra de validación

La muestra de validación del método corrió en el cromatógrafo de gases por tres días diferentes cada uno con tres repeticiones. En la Tabla 4.8, 4.9 y 4.10 se indican el tiempo, la altura y el área de cada analito.

Tabla 4.8. Datos de Tiempo, Altura y Área del Extracto de 1 ppm, día 1

<b>DDVP</b>	<b>EXTRACTO 1 PPM</b>			
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	18,604	50771,290	519757,350
	2	18,613	49971,890	508068,310
	3	18,624	48969,770	500032,350
<b>PHOSDRIN</b>	<b>EXTRACTO 1 PPM</b>			
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	24,760	39220,850	396200,710
	2	24,775	39297,630	392665,000
	3	24,787	39285,250	393434,560
<b>ETHOPROPOS</b>	<b>EXTRACTO 1 PPM</b>			
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	31,180	55295,000	455395,920
	2	31,199	54396,890	454607,000
	3	31,212	53649,200	454920,520
<b>PARATHION</b>	<b>EXTRACTO 1 PPM</b>			
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	36,304	15867,450	171675,810
	2	36,315	14892,880	159232,460
	3	36,347	15564,250	163517,370

CLORPHIRIFOS	EXTRACTO 1 PPM			
	CORRIDA	TIEMPO (min)	HEIGHT (uV)	AREA (uV*s)
	1	41,185	23628,890	220912,730
	2	41,208	22494,460	208183,730
	3	41,221	22978,870	212873,790
STIROFOS	EXTRACTO 1 PPM			
	CORRIDA	TIEMPO (min)	HEIGHT (uV)	AREA (uV*s)
	1	44,374	9747,120	75453,760
	2	44,385	9029,260	70071,810
	3	44,409	9707,880	77104,840
DISULFOTON	EXTRACTO 1 PPM			
	CORRIDA	TIEMPO (min)	HEIGHT (uV)	AREA (uV*s)
	1	44,571	16508,880	204487,020
	2	44,595	14796,020	181254,740
	3	44,614	17731,360	201971,440

Tabla 4.9. Datos de Tiempo, Altura y Área del Extracto de 1 ppm, día 2

DDVP	EXTRACTO 1 PPM			
	CORRIDA	TIEMPO (min)	HEIGHT (uV)	AREA (uV*s)
	1	18,685	36120,410	386198,900
	2	18,693	37962,940	410073,460
	3	18,709	35510,140	380524,050
PHOSDRIN	EXTRACTO 1 PPM			
	CORRIDA	TIEMPO (min)	HEIGHT (uV)	AREA (uV*s)
	1	24,852	29384,120	306698,460
	2	24,858	31493,270	327515,020
	3	24,876	29010,150	299681,430
ETHOPROPOS	EXTRACTO 1 PPM			
	CORRIDA	TIEMPO (min)	HEIGHT (uV)	AREA (uV*s)
	1	31,302	39034,890	343201,920
	2	31,308	41682,220	364536,340
	3	31,328	37458,100	329965,230
PARATHION	EXTRACTO 1 PPM			
	CORRIDA	TIEMPO (min)	HEIGHT (uV)	AREA (uV*s)
	1	36,462	11422,700	123244,770
2	36,482	12472,230	134363,690	



	3	36,494	11076,860	119235,570
<b>CLORPHIRIFOS</b>	<b>EXTRACTO 1 PPM</b>			
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	41,352	15659,960	134961,570
	2	41,360	17655,170	168967,740
	3	41,381	15235,340	149701,590
<b>STIROFOS</b>	<b>EXTRACTO 1 PPM</b>			
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	44,537	6804,660	59947,500
	2	44,554	7906,300	71844,980
	3	44,570	6439,020	59179,920
<b>DISULFOTON</b>	<b>EXTRACTO 1 PPM</b>			
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	44,748	14042,970	147748,820
	2	44,777	16301,660	177290,580
	3	44,784	13771,640	152015,970

**Tabla 4.10. Datos de Tiempo, Altura y Área del Extracto de 1 ppm, día 3**

<b>DDVP</b>	<b>EXTRACTO 1 PPM</b>			
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	18,775	30190,720	342089,650
	2	18,783	31503,360	364926,370
	3	18,789	29372,210	349370,640
<b>PHOSDRIN</b>	<b>EXTRACTO 1 PPM</b>			
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	24,949	25627,030	286776,390
	2	24,960	26679,150	299502,410
	3	24,964	24778,410	280141,440
<b>ETHOPROPOS</b>	<b>EXTRACTO 1 PPM</b>			
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	31,421	31045,760	281594,070
	2	31,437	32350,540	288757,090
	3	31,441	30709,010	280246,270
<b>PARATHION</b>	<b>EXTRACTO 1 PPM</b>			
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	36,629	9185,570	109138,490

	2	36,646	10730,080	126015,770
	3	36,651	9671,990	111620,910
<b>CLORPHIRIFOS</b>	<b>EXTRACTO 1 PPM</b>			
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	41,417	11108,840	102100,440
	2	41,532	13864,000	145420,000
	3	41,539	12217,950	115926,160
<b>STIROFOS</b>	<b>EXTRACTO 1 PPM</b>			
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	44,720	4807,490	44640,750
	2	44,749	6362,230	62576,190
	3	44,757	5773,460	54524,470
<b>DISULFOTON</b>	<b>EXTRACTO 1 PPM</b>			
	<b>CORRIDA</b>	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>HEIGHT (uV )</b>	<b>AREA (uV*s)</b>
	1	44,932	8948,760	112383,620
	2	44,960	9388,590	145879,640
	3	44,979	9228,710	134564,730

## CAPÍTULO V

### CALCULOS Y RESULTADOS

Se cuenta con un protocolo analítico que ayuda a determinar si el método de análisis es funcional, por lo que se evaluaron varios parámetros descritos en este capítulo en el que se describe el cálculo realizado y sus respectivos resultados.

Para los cálculos siguientes se ha toma como ejemplo el caso del analito **DDVP**, y en las siguientes tablas se encontrara detallado los resultados obtenidos de cada analito, realizando los mismos cálculos estadísticos para cada uno de ellos.

#### 4.4. Curva de Calibración del Equipo

Se mide en el equipo los estándares de 0,6 ppm, 1 ppm, 10 ppm y 14 ppm. Se realiza 3 repeticiones.

Con los datos de áreas de las tablas 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 y 4.7 del capítulo IV se calcula los promedios de la tabla 5.1 y 5.2.

$$Pr\ omedio = \frac{58482,020 + 45914,580 + 43648,980}{3}$$

$$Pr\ omedio = 49348,527(\mu V * s)$$

**Tabla 5.1. Promedio de Áreas de Estándares para la Curva de Calibración**

	<b>0,6 PPM (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>)</b>	<b>1 PPM (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>)</b>	<b>10 PPM (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>)</b>	<b>14 PPM (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>)</b>
<b>DDVP</b>	49348,5267	928919,6333	20081394,2800	29863308,7233
<b>PHOSDRIN</b>	39994,6100	746475,7067	16302698,8433	25446818,4300
<b>ETHOPROPHOS</b>	57579,8467	914675,5433	14122527,7700	19927530,6133
<b>PARATHION</b>	19783,9967	435864,5533	8697545,1567	17090262,4567
<b>CHLORPYRIFOS</b>	20757,2633	490504,8433	11890280,8733	18617404,2500
<b>STIROFOS</b>	12106,0067	258960,3033	5849456,6633	30323454,9300
<b>DISULFOTON SULFON</b>	16998,4100	408274,7833	10971203,6033	-----

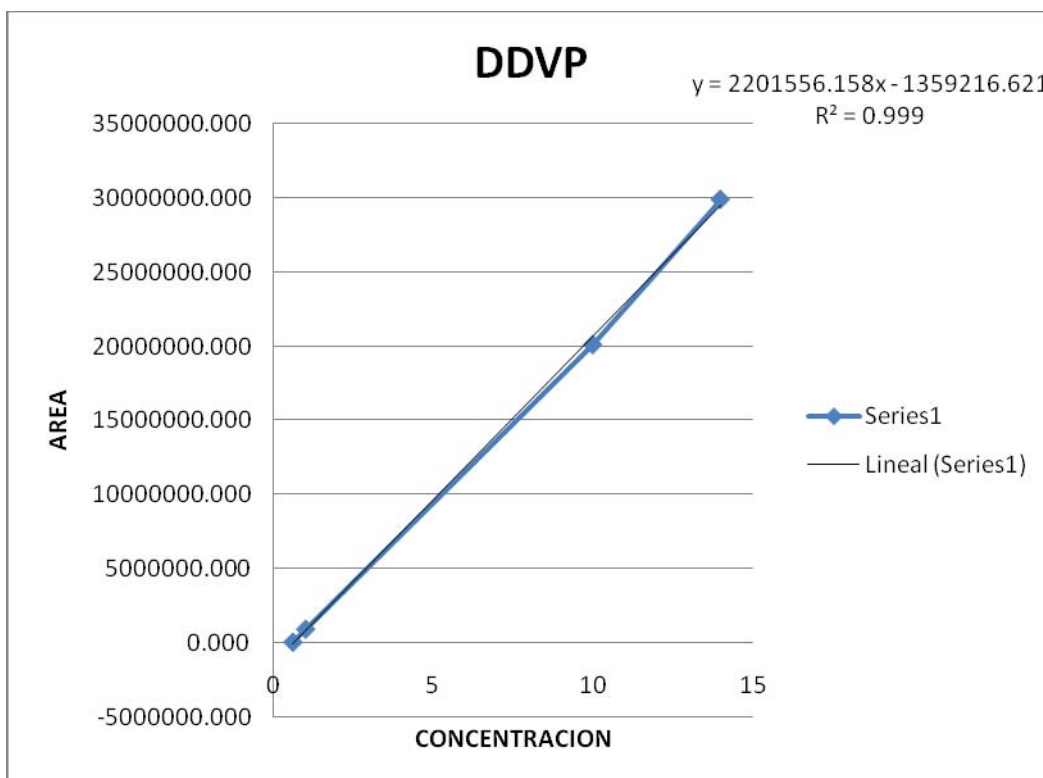
**Tabla 5.2. Promedio de Áreas de Blancos**

<b>ANALITO</b>	<b>PROMEDIO (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>)</b>
<b>DDVP</b>	9016,7678
<b>PHOSDRIN</b>	0,0000
<b>ETHOPROPHOS</b>	1565,5600
<b>PARATHION</b>	2577,6289
<b>CHLORPYRIFOS</b>	12827,3389
<b>STIROFOS</b>	0,0000
<b>DISULFOTON SULFON</b>	5054,2822

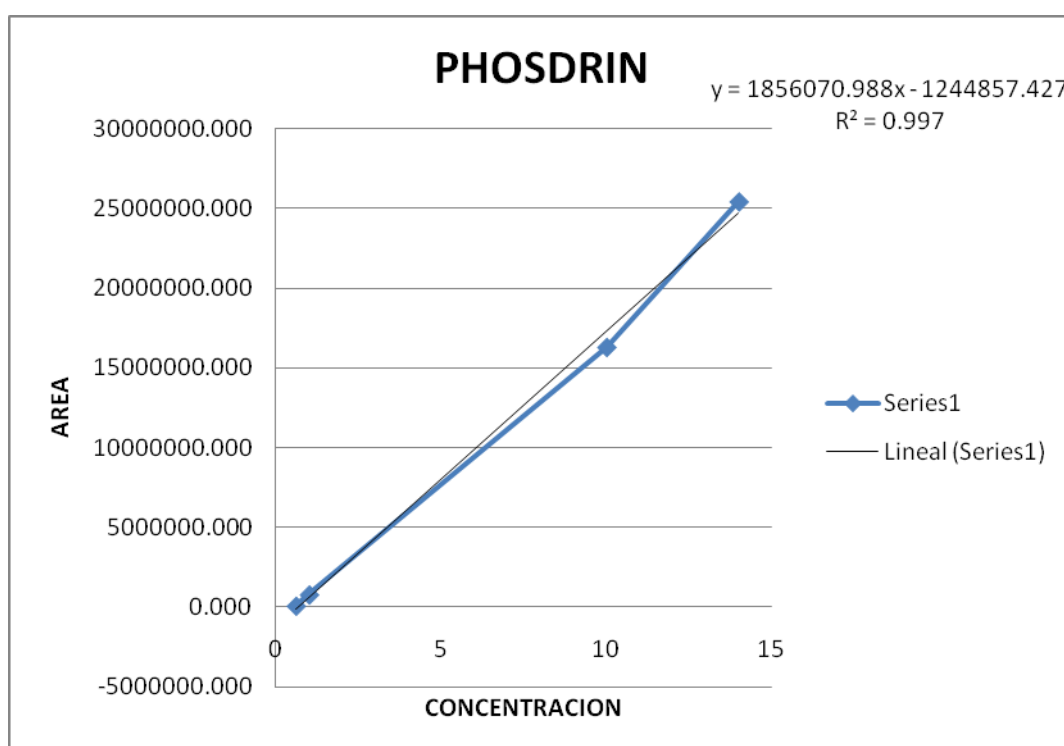
Con los promedios de las áreas de los estándares obtenidos se realiza el gráfico:  $A = f(C)$

A = área

C = concentración



**Figura 5.1. Gráfica de la Ecuación Lineal para el Analito DDVP**



**Figura 5.2. Gráfica de la Ecuación Lineal para el Analito Phosdrin**

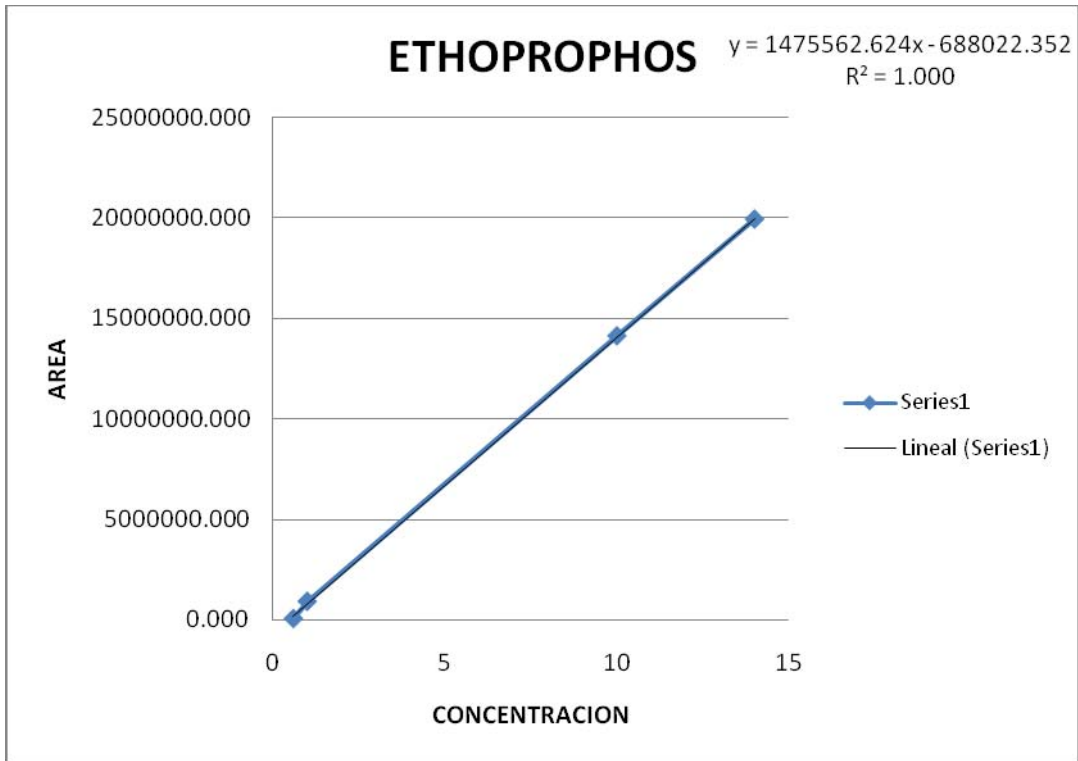


Figura 5.3. Gráfica de la Ecuación Lineal para el Analito Ethoprophos

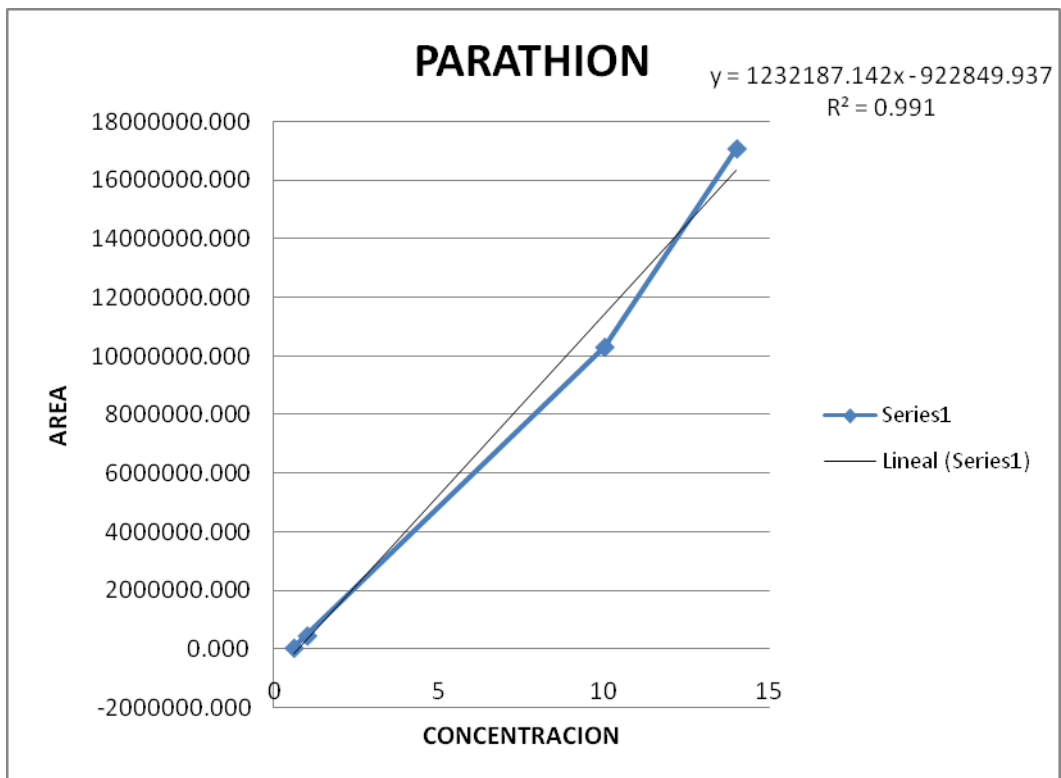


Figura 5.4. Gráfica de la Ecuación Lineal para el Analito Parathion

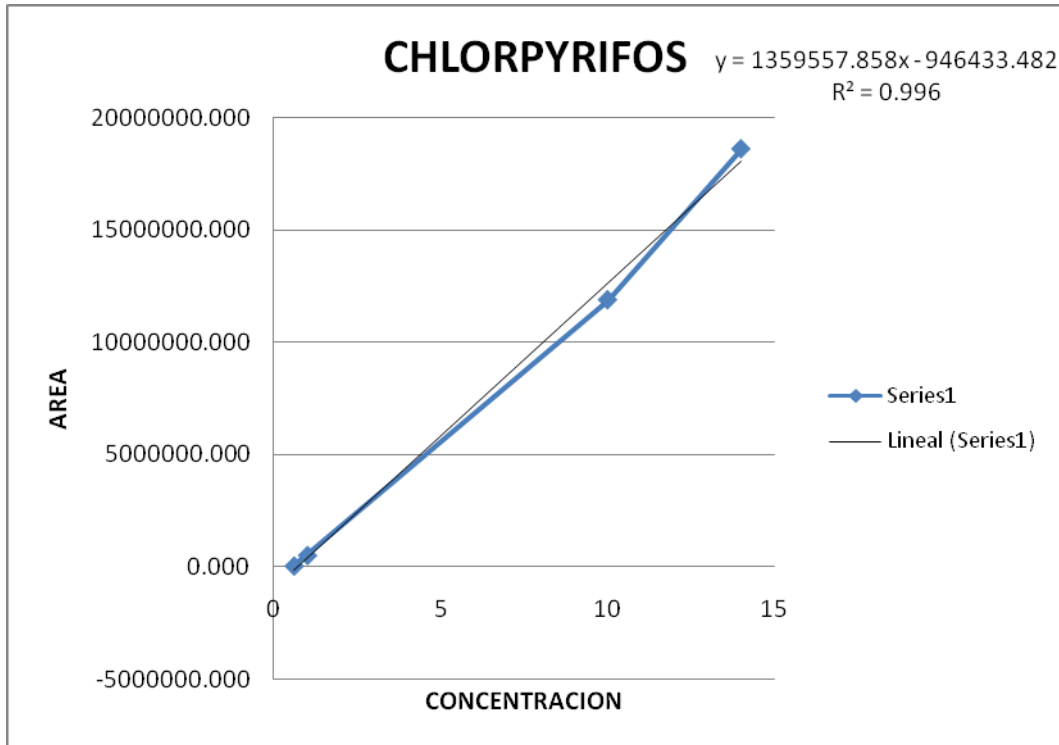


Figura 5.5. Gráfica de la Ecuación Lineal para el Analito Chlorpirifos

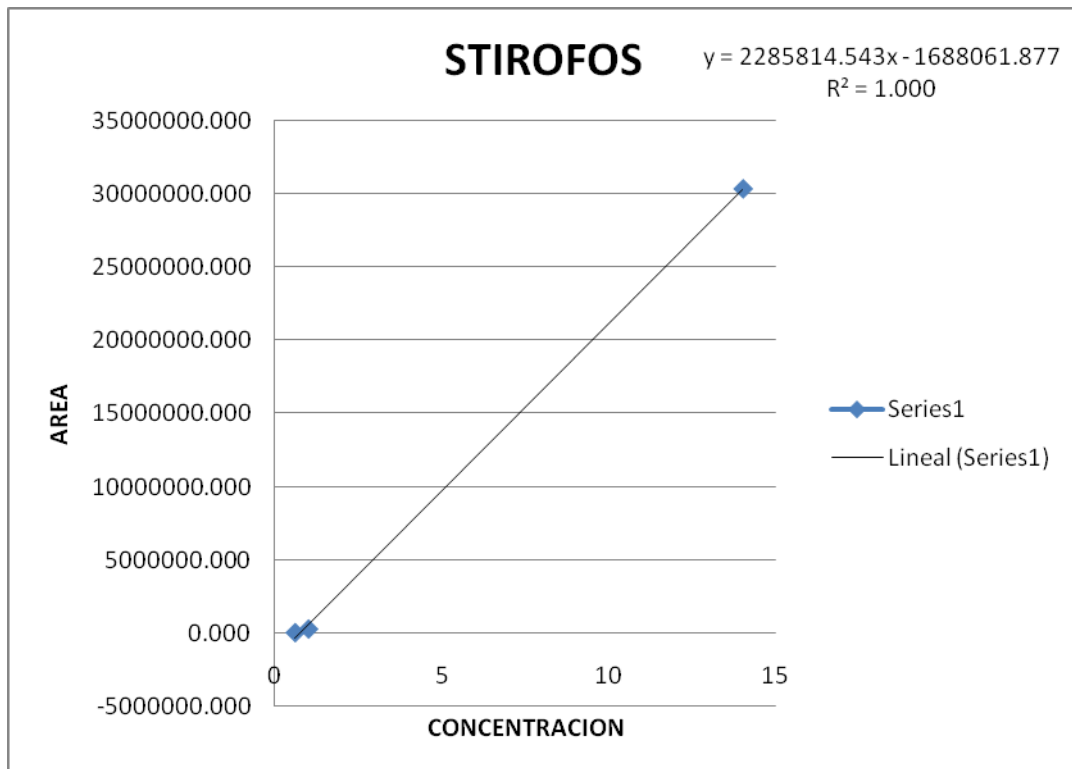
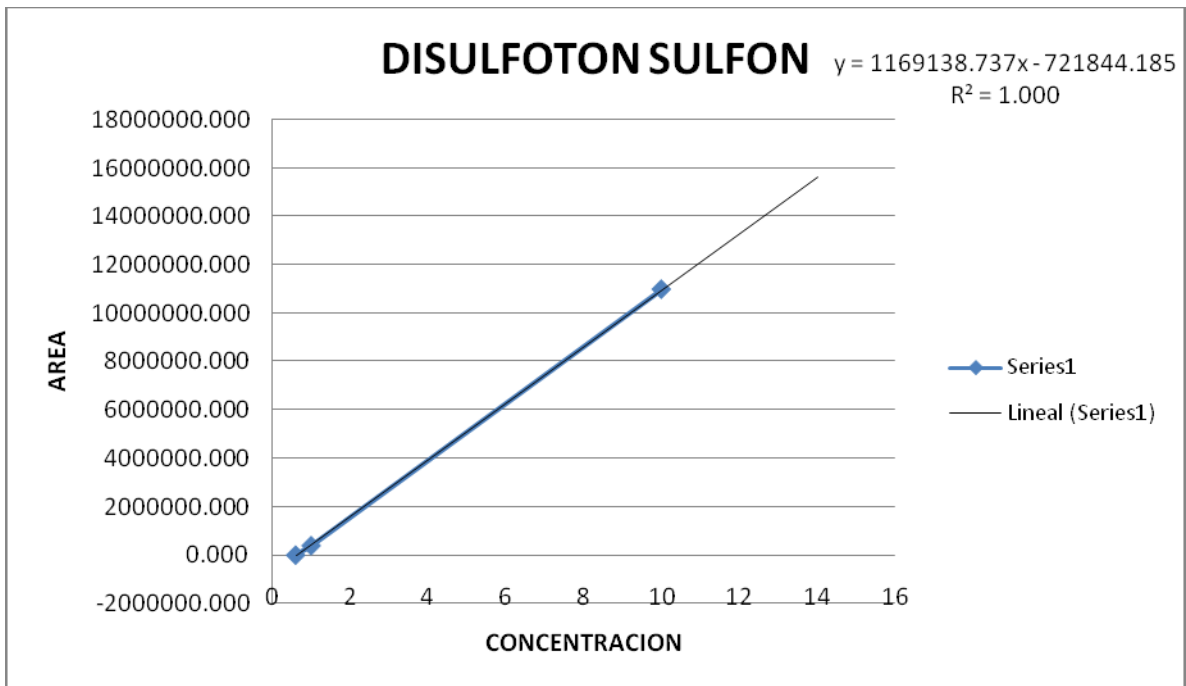


Figura 5.6. Gráfica de la Ecuación Lineal para el Analito Stirofos



**Figura 5.7. Gráfica de la Ecuación Lineal para el Analito Disulfoton Sulfon**

#### 4.5. Cálculo de Concentración del Extracto de 1 ppm

Con las ecuaciones obtenidas de la regresión lineal y los datos de áreas de las tablas 4.8, 4.9 y 4.10 se calcula las concentraciones (Tabla 5.3).

- Para el analito DDVP del extracto de 1 ppm

$$y = 2201556,158x - 1359216,621$$

Y = Área ( $\mu V \cdot s$ )

X = Concentración (mg/L)

$$x = \frac{519757,350 + 1359216,621}{2201556,158}$$

$$X = 0,8535 \text{ mg/L}$$



**Tabla 5.3. Concentración por Analito del Extracto de 1 ppm**

<b>ANALITO</b>		<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 3</b>
<b>DDVP</b>	<b>CORRIDA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>
	1	0,8535	0,7928	0,7728
	2	0,8482	0,8037	0,7831
	3	0,8445	0,7902	0,7761
<b>PHOSDRIN</b>	<b>CORRIDA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>
	1	0,8842	0,8359	0,8252
	2	0,8823	0,8472	0,8321
	3	0,8827	0,8322	0,8216
<b>ETHOPROPPOS</b>	<b>CORRIDA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>
	1	0,7749	0,6989	0,6571
	2	0,7744	0,7133	0,6620
	3	0,7746	0,6899	0,6562
<b>PARATHION</b>	<b>CORRIDA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>
	1	0,8883	0,8490	0,8375
	2	0,8782	0,8580	0,8512
	3	0,8817	0,8457	0,8395
<b>CHLORPYRIFOS</b>	<b>CORRIDA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>
	1	0,8586	0,7954	0,7712
	2	0,8493	0,8204	0,8031
	3	0,8527	0,8062	0,7814
<b>STIROFOS</b>	<b>CORRIDA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>
	1	0,7715	0,7647	0,7580
	2	0,7691	0,7699	0,7659
	3	0,7722	0,7644	0,7623
<b>DISULFOTON SULFON</b>	<b>CORRIDA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>
	1	0,7923	0,7438	0,7135
	2	0,7724	0,7691	0,7422
	3	0,7902	0,7474	0,7325

De la misma manera se procede con los blancos Tabla 5.4

**Tabla 5.4. Concentración por Analito de Extracto Blancos**

<b>ANALITO</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>
<b>DDVP</b>	0,6215
<b>PHOSDRIN</b>	0,6707
<b>ETHOPROPHOS</b>	0,4673
<b>PARATHION</b>	0,7510
<b>CHLORPYRIFOS</b>	0,7056
<b>STIROFOS</b>	0,7385
<b>DISULFOTON SULFON</b>	0,6217

A continuación a la concentración del extracto de 0,03 ppm se resta la concentración de los blancos (Tabla 5.5)

$$= 0,8535 - 0,6215$$

$$= 0,2320$$

#### **4.6. Transformación en Muestra de 0,03 ppm**

Al valor obtenido de la concentración del extracto de 1 ppm (Tabla 5.3) se le debe aplicar la ecuación N° 27 del capítulo III para obtener la concentración en muestra (Tabla 5.5).

$$C = \frac{A(mg/L)}{1000 \times m(Kg)}$$

A = área (mg/L)

m = masa del banano (Kg)

$$C = \frac{0,2320(mg/L)}{1000 * 0,03(Kg)}$$

$$C = 0,0077 mg / Kg$$

Tabla 5.5. Concentración por Analito de la Muestra de 0,03 ppm

ANALITO		DIA 1	DIA 2	DIA 3
DDVP	<b>CORRIDA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>
	1	0,0077	0,0057	0,0050
	2	0,0076	0,0061	0,0054
	3	0,0074	0,0056	0,0052
PHOSDRIN	<b>CORRIDA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>
	1	0,0071	0,0055	0,0052
	2	0,0071	0,0059	0,0054
	3	0,0071	0,0054	0,0050
ETHOPROPHOS	<b>CORRIDA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>
	1	0,0103	0,0077	0,0063
	2	0,0102	0,0082	0,0065
	3	0,0102	0,0074	0,0063
PARATHION	<b>CORRIDA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>
	1	0,0046	0,0033	0,0029
	2	0,0042	0,0036	0,0033
	3	0,0044	0,0032	0,0029
CHLORPYRIFOS	<b>CORRIDA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>
	1	0,0051	0,0030	0,0022
	2	0,0048	0,0038	0,0033
	3	0,0049	0,0034	0,0025
STIROFOS	<b>CORRIDA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>
	1	0,0011	0,0009	0,0007
	2	0,0010	0,0010	0,0009
	3	0,0011	0,0009	0,0008
DISULFOTON SULFON	<b>CORRIDA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>
	1	0,0057	0,0041	0,0031
	2	0,0050	0,0049	0,0040
	3	0,0056	0,0042	0,0037

Tabla 5.6. Concentración por Analito de la Muestra del Blanco

ANALITO		DIA 1	DIA 2	DIA 3
DDVP	<b>CORRIDA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>
	1	0,0206	0,0213	0,0206
	2	0,0206	0,0211	0,0206
	3	0,0206	0,0206	0,0206
PHOSDRIN	<b>CORRIDA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>
	1	0,0224	0,0224	0,0224
	2	0,0224	0,0224	0,0224
	3	0,0224	0,0224	0,0224
ETHOPROPHOS	<b>CORRIDA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>
	1	0,0157	0,0155	0,0155
	2	0,0156	0,0155	0,0155
	3	0,0156	0,0155	0,0155
PARATHION	<b>CORRIDA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>
	1	0,0252	0,0250	0,0250
	2	0,0252	0,0250	0,0250
	3	0,0252	0,0250	0,0250
CHLORPYRIFOS	<b>CORRIDA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>
	1	0,0241	0,0235	0,0232
	2	0,0240	0,0234	0,0232
	3	0,0239	0,0232	0,0232
STIROFOS	<b>CORRIDA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>
	1	0,0246	0,0246	0,0246
	2	0,0246	0,0246	0,0246
	3	0,0246	0,0246	0,0246
DISULFOTON SULFON	<b>CORRIDA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/Kg)</b>
	1	0,0206	0,0212	0,0206
	2	0,0206	0,0213	0,0206
	3	0,0206	0,0206	0,0206

#### 4.7. Parámetros de Validación:

##### 4.7.1. Límite de Detección:

Para el cálculo del Límite de detección se usará la fórmula N° 12 detallada en el capítulo II.

Para calcular la desviación típica se debe encontrar la varianza de los datos por día, para lo cual se calcula la media por día a partir de la tabla 5.6.

$$\bar{X} = \frac{0,0206 + 0,0206 + 0,0206}{3}$$

$$\bar{X} = 0,0206 \text{ mg/Kg}$$

Cálculo de la varianza

$$\sigma^2 = \frac{(0,0206 - 0,0206)^2 + (0,0206 - 0,0206)^2 + (0,0206 - 0,0206)^2}{3}$$

$$\sigma^2 = 0,00 * 10^0 \text{ mg/Kg}$$

Cálculo de la desviación típica

$$\sigma = \sqrt{0,00 * 10^0}$$

$$\sigma = 0,00 * 10^0 \text{ mg/Kg}$$

De la misma manera se trabaja para el día 2 y el día 3, finalmente se suman las varianzas de los 3 días. (Tabla 5.7)

$$\sigma^2 = (0,00 * 10^0)^2 + (2,77 * 10^{-4})^2 + (0,00 * 10^0)^2$$

$$\sigma = \sqrt{7,6729 * 10^{-8}}$$

$$\sigma = 2,77 * 10^{-4} \text{ mg/kg}$$

Los resultados de la desviación típica se encuentran en la Tabla 5.8

Calculo de la media general

$$\bar{X} = \frac{0,0206 + 0,0206 + 0,0206 + 0,0213 + 0,0211 + 0,0206 + 0,0206 + 0,0206 + 0,0206}{9}$$

$$\bar{X} = 0,0207 \text{ mg/Kg}$$

Los resultados de la media general se encuentran en la Tabla 5.8

Cálculo del Límite de Detección

$$LoD = B + 3 * Sb$$

$$LoD = 0,0207 + 3 * 2,77 * 10^{-4}$$

$$LoD = 0,0215 \text{ mg/Kg}$$

Los resultados del límite de detección se encuentran en la Tabla 5.8

#### 5.4.2 Límite de Cuantificación:

Para calcular el Límite de Cuantificación se usará la fórmula N° 11 del capítulo II

$$LoC = 0,0207 + 10 * 2,77 * 10^{-4}$$

$$LoC = 0,0235 \text{ mg/Kg}$$

Tabla 5.7. Limite de Detección y Cuantificación por Analito

ANALITO	$\delta$ (mg/Kg)	X (mg/Kg)	LoD (mg/Kg)	LoC (mg/Kg)
DDVP	$2,77 * 10^{-4}$	0,0207	0,0215	0,0235
PHOSDRIN	$0,00 * 10^0$	0,0224	0,0224	0,0224
ETHOPROPHOS	$5,35 * 10^{-5}$	0,0156	0,0157	0,0161
PARATHION	$1,05 * 10^{-4}$	0,0250	0,0253	0,0261
CHLORPYRIFOS	$3,62 * 10^{-4}$	0,0235	0,0246	0,0271
STIROFOS	$3,68 * 10^{-18}$	0,0246	0,0246	0,0246
DISULFOTON SULFON	$2,86 * 10^{-4}$	0,0207	0,0216	0,0236

#### 5.4.3 Precisión (Repetibilidad y/o Reproducibilidad):

##### Procesamiento de datos:

Con los datos de la tabla 5.5 se procede a obtener:

Promedio diario y el promedio general de la concentración de 0,03 ppm para el DDVP (Tabla 5.8)

$$\bar{X} = \frac{0,0077 + 0,0076 + 0,0074}{3}$$

$$\bar{X} = 0,0076 \text{ mg/Kg}$$

Se procede a calcular la varianza por día (Tabla 5.8)

$$\sigma^2 = \frac{(0,0077 - 0,0076)^2 + (0,0076 - 0,0076)^2 + (0,0074 - 0,0076)^2}{3}$$

$$\sigma^2 = 2,26 * 10^{-8} \text{ mg/Kg}$$

Se calcula la desviación típica con los datos obtenidos de los tres días de repetición.

$$\sigma^2 = \frac{(0,008 - 0,006)^2 + (0,006 - 0,006)^2 + (0,005 - 0,006)^2}{3}$$

$$\sigma^2 = 1,17 * 10^{-6} \text{ mg/Kg}$$

$$\sigma = \sqrt{1,17 * 10^{-6}}$$

$$\sigma = 1,08 \times 10^{-3} \text{ mg/Kg}$$

Se calcula la media general

$$\bar{X} = \frac{0,0077 + 0,0057 + 0,0050 + 0,0076 + 0,0061 + 0,0054 + 0,0074 + 0,0056 + 0,0052}{9}$$

$$\bar{X} = 0,0062 \text{ mg/Kg}$$



**Tabla 5.8. Análisis para la Muestra de 0,03 ppm Analito DDVP**

DDVP	DIA 1	DIA 2	DIA 3
1	0,008	0,006	0,005
2	0,008	0,006	0,005
3	0,007	0,006	0,005
Promedio diario	0,008	0,006	0,005
Promedio general	0,006		
Varianza	$2,255 \cdot 10^{-08}$	$5,637 \cdot 10^{-08}$	$3,120 \cdot 10^{-08}$
Desviación Estándar	$1,08 \cdot 10^{-03}$		

Análisis simple de la varianza, ANOVA (Tabla 2.8) detallada en el Capítulo II

Se especifica grados de libertad

- $n = 3$
- Entre grupos  $\nu 1 = 3 - 1 = 2$
- Dentro del grupo  $\nu 2 = 9 - 3 = 6$
- Suma de diferencias cuadráticas dentro del grupo:

$$SDC_w = 4,51 \cdot 10^{-8} + 1,13 \cdot 10^{-7} + 6,24 \cdot 10^{-8}$$

$$SDC_w = 2,20 \cdot 10^{-7} \text{ mg/Kg}$$

- Suma de diferencias cuadráticas entre grupos:

$$SDC_B = 3 \times 3,06 * 10^{-6}$$

$$SDC_B = 9,17 * 10^{-6} \text{ mg/Kg}$$

- Diferencias cuadráticas medias dentro del grupo:

$$DCM_w = \frac{2,20 * 10^{-7}}{6}$$

$$DCM_w = 3,67 * 10^{-8} \text{ mg/Kg}$$

- Diferencias cuadráticas medias entre grupos:

$$DCM_B = \frac{9,17 * 10^{-6}}{2}$$

$$DCM_B = 4,59 * 10^{-6} \text{ mg/Kg}$$

**Tabla 5.9. Resultados ANOVA de la Muestra de 0,03ppm por Analito**

<b>ANALITO</b>	<b>SDCw mg/Kg</b>	<b>SDCB mg/Kg</b>	<b>DCMw mg/Kg</b>	<b>DCMB mg/Kg</b>
<b>DDVP</b>	$2,20 * 10^{-07}$	$9,17 * 10^{-06}$	$3,67 * 10^{-08}$	$4,59 * 10^{-06}$
<b>PHOSDRIN</b>	$2,00 * 10^{-07}$	$5,95 * 10^{-06}$	$3,33 * 10^{-08}$	$2,98 * 10^{-06}$
<b>ETHOPROPHOS</b>	$3,32 * 10^{-07}$	$2,31 * 10^{-05}$	$5,53 * 10^{-08}$	$1,15 * 10^{-05}$
<b>PARATHION</b>	$2,70 * 10^{-07}$	$2,97 * 10^{-06}$	$4,50 * 10^{-08}$	$1,49 * 10^{-06}$
<b>CHLORPYRIFOS</b>	$9,88 * 10^{-07}$	$8,09 * 10^{-06}$	$1,65 * 10^{-07}$	$4,05 * 10^{-06}$
<b>STIROFOS</b>	$6,15 * 10^{-08}$	$1,31 * 10^{-07}$	$1,03 * 10^{-08}$	$6,57 * 10^{-08}$
<b>DISULFOTON SULFON</b>	$1,15 * 10^{-06}$	$5,18 * 10^{-06}$	$1,92 * 10^{-07}$	$2,59 * 10^{-06}$

A continuación, se calcula la desviación estándar de la repetibilidad ( $s_r$ ) con la fórmula N° 16, detallada en el capítulo II

$$s_r = \sqrt{3,67 * 10^{-8}} = 1,92 * 10^{-4} \text{ mg/Kg}$$

Para el cálculo de la reproducibilidad se usa la fórmula N° 18 y 17 respectivamente, detallada en el capítulo II

$$s_L^2 = \frac{4,59 * 10^{-6} - 3,67 * 10^{-8}}{3} = 1,52 * 10^{-6} \text{ mg/Kg}$$

Cuando el  $S_L^2 < 0$  debe asumirse 0

Reproducibilidad ( $s_R$ )

$$s_R = \sqrt{(1,92 * 10^{-4})^2 + (1,52 * 10^{-6})^2} = 1,92 * 10^{-4} \text{ mg/Kg}$$

Cálculo de los coeficientes de variación de repetibilidad

$$cvr(\%) = \frac{S_r}{\min \bar{x}_{PROMEDIO}} \times 100 = \frac{1,92 * 10^{-4}}{0,0052} \times 100 = 3,69\%$$

$$CVR(\%) = \frac{S_R}{\bar{x}_{PROMEDIOS}} \times 100 = \frac{1,92 * 10^{-4}}{0,0062} \times 100 = 3,09\%$$

Para Organofosforados totales se debe trabajar la repetibilidad y la reproducibilidad de la misma manera que el ejemplo detallado anteriormente con la única diferencia que los datos analizados son la suma de las concentraciones de los 7 analitos analizados así tenemos la Tabla 5.10 y sus resultados en la Tabla 5.11

**Tabla 5.10. Análisis de Organofosforados Totales**

OF_totales	DIA 1	DIA 2	DIA 3
1	0,042	0,030	0,025
2	0,040	0,034	0,029
3	0,041	0,030	0,027
Promedio diario	0,041	0,031	0,027
Promedio general	0,033		
Varianza	$6,890 \times 10^{-07}$	$3,983 \times 10^{-06}$	$3,161 \times 10^{-06}$
Desviación Estándar	$6,33 \times 10^{-03}$		

**Tabla 5.11. Resultados de Precisión (Repetibilidad, Reproducibilidad y Coeficiente de Variación)**

ANALITO	Sr mg/Kg	S2L mg/Kg	SR mg/Kg	cvr (%)	CVR (%)
DDVP	$1,92 \times 10^{-04}$	$1,52 \times 10^{-06}$	$1,92 \times 10^{-04}$	3,688	3,095
PHOSDRIN	$1,83 \times 10^{-04}$	$9,81 \times 10^{-07}$	$1,83 \times 10^{-04}$	3,694	3,066
ETHOPROPHOS	$2,35 \times 10^{-04}$	$3,82 \times 10^{-06}$	$2,35 \times 10^{-04}$	3,008	2,894
PARATHION	$2,12 \times 10^{-04}$	$4,80 \times 10^{-07}$	$2,12 \times 10^{-04}$	6,046	5,906
CHLORPYRIFOS	$4,06 \times 10^{-04}$	$1,29 \times 10^{-06}$	$4,06 \times 10^{-04}$	7,214	11,087
STIROFOS	$1,01 \times 10^{-04}$	$1,85 \times 10^{-08}$	$1,01 \times 10^{-04}$	24,369	10,862
DISULFOTON SULFON	$4,38 \times 10^{-04}$	$7,99 \times 10^{-07}$	$4,38 \times 10^{-04}$	5,338	9,790
OF_TOTALES	$1,62 \times 10^{-03}$	$5,00 \times 10^{-05}$	$1,62 \times 10^{-03}$	0,711	4,890

#### 5.4.4 Determinación de la Incertidumbre del método:

##### ➤ Cálculo de la Incertidumbre

Se debe expresar las medidas con los valores de incertidumbre:

$$X \pm U \quad (28)$$

U = Incertidumbre absoluta (expandida)

X = Valor de medida

Incertidumbre Expandida

$$U = k * u(y) \quad (29)$$

u (y) = Incertidumbre estándar

k = Factor de cobertura, por el nivel de confianza

$$u(y) = \sqrt{\sum u_n^2} \quad (30)$$

$\sum u_n^2$  = Sumatoria cuadrática de las incertidumbres parciales de cada uno de los elementos involucrados en el sistema

➤ **Incertidumbre de Soluciones:**

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad (31)$$

$$C_2 = \frac{C_1 \times V_1}{V_2} \quad (32)$$

$$C_2 = \frac{C_1 \pm \frac{\mu C_1}{C_1} \times V_1 \pm \frac{\mu V_1}{V_1}}{V_2 \pm \frac{\mu V_2}{V_2}} \quad (33)$$

$$\mu C_2 = C_2 \times \sqrt{\left(\frac{\mu C_1}{C_1}\right)^2 + \left(\frac{\mu V_1}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{\mu V_2}{V_2}\right)^2} \quad (34)$$

Donde:

$C_1$  = concentración del analito (mg/Kg)

$C_2$  = concentración del estándar de calibración (mg/Kg)

$\mu C_1$  = incertidumbre de  $C_1$

$V_1$  = volumen de aforo de las muestras (mL)

$\mu V_1$  = incertidumbre de  $V_1$

$V_2$  = volumen tomado de la solución estándar (mL)

$\mu V_2$  = incertidumbre del  $V_1$

Para el cálculo de la incertidumbre es necesario conocer las incertidumbres de los materiales (Tabla 5.12) usados durante el proceso de elaboración de las soluciones así como también las concentraciones de cada uno de los analitos del mix de pesticidas organofosforados. (Tabla 5.13).

Para el caso se usa una distribución triangular es decir la incertidumbre conocida de los materiales dividido para la  $\sqrt{6}$ , para el estándar que tiene un factor de cobertura  $k = 2$  se divide para este valor.

**Tabla 5.12. Incertidumbre del Material**

$\mu$	MATERIAL
0,6700	ESTÁNDAR
0,0400	balón de 25 ml
0,0200	balón de 10 ml
0,1000	balón de 100 ml
0,1500	balón de 250 ml
0,3000	balón de 1000 ml
0,0060	pipeta

**Tabla 5.13. Concentraciones del Mix de Pesticidas Organofosforados**

Analito	Concentraciones ppm
Dichlorvos(DDVP)	501.76
Mevinphos(Phosdrin)	500.00
Ethoprophos	499.80
Methyl Paraoxon(Parathion)	502.00
Chlorpyrifos(Dursban)	500.00
Stirofos(Tetrachlorvinphos)	504.96
Disulfoton Sulfon	502.00

Ecuación de concentración de la solución de calibración de 500 ppm a 10 ppm, usando la fórmula N° 32, detallada en este capítulo:

$$C_2 = \frac{500 \text{ ppm} \times 0,5 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} = 10 \text{ ppm}$$

Calculo de la incertidumbre de la solución de 10 ppm, fórmula N° 33, descrita anteriormente

$$C_2 = \frac{500 \text{ ppm} \pm \frac{0,67}{2} \times 0,5 \text{ gr} \pm \frac{0,006}{\sqrt{6}}}{25 \text{ mL} \pm \frac{0,04}{\sqrt{6}}}$$

Reemplazando en la ecuación (34)

$$\mu C_2 = 10 \text{ ppm} \times \sqrt{\left(\frac{0,67}{500}\right)^2 + \left(\frac{0,006}{0,5}\right)^2 + \left(\frac{0,04}{25}\right)^2}$$

$$\mu C_2 = \pm 0,0499$$

En la tabla 5.14 hasta la tabla 5.18 se indican los valores de incertidumbre de las soluciones.

**Tabla 5.14. Incertidumbre de Soluciones del Analito DDVP**

ESTANDAR		
CONCENTRACION ppm	V1 = ml TOMADOS DEL ESTANDAR	$\mu C_2$
501,760	0,0000	
10	0,4982	0,0500
1	1,0000	0,0057
1	1,0000	0,0066

**Tabla 5.15. Incertidumbres de Soluciones de los Analito Phosdrin y Chlorpyrifos**

ESTANDAR		
CONCENTRACION ppm	V1 = ml TOMADOS DEL ESTANDAR	$\mu C_2$
500	0,0000	
10	0,5000	0,0499
1	1,0000	0,0056
1	1,000	0,0066

**Tabla 5.16. Incertidumbres de Soluciones del Analito Ethoprophos**

ESTANDAR		
CONCENTRACION ppm	V1 = ml TOMADOS DEL ESTANDAR	$\mu C_2$
499,800	0,0000	
10	0,5002	0,0499
1	1,0000	0,0056
1	1,0000	0,0066



**Tabla 5.17. Incertidumbres de Soluciones del Analito Stirofos**

ESTANDAR		
CONCENTRACION ppm	V1 = ml TOMADOS DEL ESTANDAR	μC2
504,960	0,0000	
10	0,4951	0,0503
1	1,0000	0,0057
1	1,0000	0,0067

**Tabla 5.18. Incertidumbres de Estándares de los Analitos Parathion y Disulfoton Sulfon**

ESTANDAR		
CONCENTRACION ppm	V1 = ml TOMADOS DEL ESTANDAR	μC2
502	0,0000	
10	0,4980	0,0501
1	1,0000	0,0057
1	1,0000	0,0066

➤ **Cálculo de la Incertidumbre Total:**

Para el cálculo de la incertidumbre total requerimos los siguientes datos por cada analito.

$$U = k \times \sqrt{u^2_{\text{precisión}} + u^2_{\text{trazabilidad}}} \quad (35)$$

Incertidumbre de precisión:

$$u_{\text{precisión}} = \frac{S}{\sqrt{N}} \quad (36)$$

**S** = Desviación Estándar de los datos

**N** = Número de Repeticiones

$$u_{\text{precisión}} = \frac{1,08 \times 10^{-3}}{\sqrt{3}}$$

$$u_{\text{precisión}} = 6,255 \times 10^{-4} \text{ mg / kg}$$

Los resultados se encuentran en la Tabla 5.19

**Tabla 5.19. Incertidumbres de Precisión**

<b>ANALITO</b>	<b>Incertidumbre Precisión mg/Kg</b>
<b>DDVP</b>	$6,255 \times 10^{-4}$
<b>PHOSDRIN</b>	$5,062 \times 10^{-4}$
<b>ETHOPROPHOS</b>	$9,872 \times 10^{-4}$
<b>PARATHION</b>	$3,809 \times 10^{-4}$
<b>CHLORPYRIFOS</b>	$6,152 \times 10^{-4}$
<b>STIROFOS</b>	$8,967 \times 10^{-5}$
<b>DISULFOTON SULFON</b>	$5,135 \times 10^{-4}$

Incertidumbre de Trazabilidad

$$u_{\text{trazabilidad}} = \sqrt{\left(\frac{u_{\text{solución}}}{k}\right)^2 + \left(\frac{S}{\sqrt{n}}\right)^2} \quad (37)$$

**K** = factor de cobertura, 1,96

**S** = Desviación estándar de los datos

**n** = Número total de datos

$$u_{\text{trazabilidad}} = \sqrt{\left(\frac{0,0066}{1,96}\right)^2 + \left(\frac{1,08 \times 10^{-3}}{\sqrt{9}}\right)^2}$$

$$u_{\text{trazabilidad}} = 3,363 \times 10^{-3} \text{ mg / Kg}$$

Los resultados se encuentran en la Tabla 5.20

**Tabla 5.20. Incertidumbres de Trazabilidad**

<b>ANALITO</b>	<b>Incertidumbre Trazabilidad mg/Kg</b>
<b>DDVP</b>	$3,363 \times 10^{-03}$
<b>PHOSDRIN</b>	$3,356 \times 10^{-03}$
<b>ETHOPROPHOS</b>	$3,391 \times 10^{-03}$
<b>PARATHION</b>	$3,350 \times 10^{-03}$
<b>CHLORPYRIFOS</b>	$3,362 \times 10^{-03}$
<b>STIROFOS</b>	$3,344 \times 10^{-03}$
<b>DISULFOTON SULFON</b>	$3,356 \times 10^{-03}$

Incertidumbre Estándar

$$U = \sqrt{(6,255 \times 10^{-3})^2 + (3,363 \times 10^{-3})^2}$$

$$U = \pm 3,420 \times 10^{-3} \text{ mg / Kg}$$

Los resultados se encuentran en la Tabla 5.21

Incertidumbre total expandida absoluta

$$U = 1,96 * 3,420 \times 10^{-3}$$

$$U = 6,704 \times 10^{-3} \text{ mg / Kg}$$

Los resultados se encuentran en la Tabla 5.21

Incertidumbre total expandida relativa

$$U = \frac{6,704 \times 10^{-3}}{0,03} \times 100$$

$$U = 22,346 \%$$

Los resultados se encuentran en la Tabla 5.21

**Tabla 5.21. Incertidumbres por Analito**

ANALITO	Incertidumbre estándar	Incertidumbre total expandida absoluta U, ppm k=1,96	U relativa	Incertidumbre total expandida relativa U,% k=1,96
DDVP	$3,420 \cdot 10^{-03}$	$6,704 \cdot 10^{-03}$	0,223	22,346
PHOSDRIN	$3,394 \cdot 10^{-03}$	$6,652 \cdot 10^{-03}$	0,221	22,173
ETHOPROPHOS	$3,532 \cdot 10^{-03}$	$6,923 \cdot 10^{-03}$	0,230	23,076
PARATHION	$3,372 \cdot 10^{-03}$	$6,609 \cdot 10^{-03}$	0,220	22,030
CHLORPYRIFOS	$3,418 \cdot 10^{-03}$	$6,699 \cdot 10^{-03}$	0,223	22,329
STIROFOS	$3,345 \cdot 10^{-03}$	$6,556 \cdot 10^{-03}$	0,218	21,852
DISULFOTON SULFON	$3,395 \cdot 10^{-03}$	$6,655 \cdot 10^{-03}$	0,221	22,183

#### 5.4.5 Exactitud - Porcentaje de Recuperación:

Para este proceso necesitamos los promedios de la concentración por analito de la muestra de 0,03 ppm los cuales se encuentran en la Tabla 5.22, los porcentajes de recuperación se presentan en la Tabla 5.23.

**Tabla 5.22. Promedios de la Concentración de la Muestra de 0,03ppm**

ANALITO	CONCENTRACION PROMEDIO mg/Kg
DDVP	0,0062
PHOSDRIN	0,0060
ETHOPROPHOS	0,0081
PARATHION	0,0036
CHLORPYRIFOS	0,0037
STIROFOS	0,0009
DISULFOTON SULFON	0,0045

$$\% R = \frac{0,006}{0,03} \times 100$$

$$\% R = 20,636$$

**Tabla 5.23. Porcentajes de Recuperación**

<b>ANALITO</b>	<b>% RECUPERACION mg/Kg</b>
<b>DDVP</b>	20,64
<b>PHOSDRIN</b>	19,84
<b>ETHOPROPHOS</b>	27,10
<b>PARATHION</b>	11,97
<b>CHLORPYRIFOS</b>	12,20
<b>STIROFOS</b>	3,11
<b>DISULFOTON SULFON</b>	14,91

**Tabla 5.24. Porcentajes de Recuperación, Estándar de Control en el Proceso de Preparación de la Muestra**

<b>ST_INICIO</b>	<b>AREA (uV*s)</b>	<b>RECUPERACION (%)</b>
<b>DDVP</b>	5887,870	0,237
<b>PHOSDRIN</b>	3876,530	0,348
<b>ETHOPROPHOS</b>	6386,660	0,545

**Tabla 5.25. Porcentajes de Recuperación, Estándar de Control en el Proceso de Filtración de la Muestra**

<b>ST_FILTRACION</b>	<b>AREA (uV*s)</b>	<b>RECUPERACION (%)</b>
<b>ETHOPROPHOS</b>	33729,510	3,633
<b>PARATHION</b>	7684,310	0,716

**Tabla 5.26. Porcentajes de Recuperación, Estándar de Control en el Proceso de Evaporación de la Muestra**

<b>ST_EVAPORACION</b>	<b>AREA (uV*s)</b>	<b>RECUPERACION (%)</b>
<b>ETHOPROPHOS</b>	67677,090	7,467
<b>PARATHION</b>	13246,190	1,496

**Tabla 5.27. Porcentajes de Recuperación usando Solvente Tolueno**

<b>TOLUENO</b>	<b>AREA (uV*s)</b>	<b>RECUPERACION (%)</b>
<b>DDVP</b>	354880,570	26,183
<b>PHOSDRIN</b>	325591,340	29,237
<b>ETHOPROPHOS</b>	439330,810	49,446
<b>PARATHION</b>	334018,000	46,467
<b>CLORPHIRIFOS</b>	317614,860	37,364
<b>STIROFOS</b>	181291,570	13,219
<b>DISULFOTON</b>	173953,240	24,077

#### 5.4.6 Intervalo de Trabajo:

El intervalo de trabajo corresponde al límite de cuantificación por analito hasta la cuantificación del estándar de 14 ppm en muestra Tabla 5.24

Tabla 5.28. Intervalo de Trabajo

<b>ANALITO</b>	<b>desde (mg/Kg)</b>	<b>hasta (mg/Kg)</b>
<b>DDVP</b>	0,0235	0,4520
<b>PHOSDRIN</b>	0,0224	0,4794
<b>ETHOPROPHOS</b>	0,0161	0,4657
<b>PARATHION</b>	0,0261	0,5086
<b>CHLORPYRIFOS</b>	0,0271	0,4463
<b>STIROFOS</b>	0,0246	0,4446
<b>DISULFOTON SULFON</b>	0,0236	-----

## CAPÍTULO VI

### DISCUSION DE RESULTADOS

- Se obtuvo un porcentaje del coeficiente de variación (*cvr*) de repetibilidad en un rango de 3,01% - 7,21% y un rango del coeficiente de variación (*CVR*) de reproducibilidad de 2,89% - 10,09% valores que se encuentran dentro del valor de referencia del 10%<sup>7</sup>, excepto para el analito Stirofos cuyo porcentaje de *cvr* fue de 24,37% el mismo que es mayor al porcentaje del *CVR* de 10,86%.
- Los porcentajes del coeficiente de variación de repetibilidad y de reproducibilidad para órgano fosforados totales son de 0,71% y 4,89% respectivamente, valores aceptables ya que se encuentran dentro del valor de referencia del 10% antes mencionado.
- La eficiencia del método de extracción se determinó como porcentaje de recuperación donde el porcentaje más bajo fue para el Stirofos con el 3,11% y el porcentaje más alto fue para el Ethoprophos con el 27,10%, datos que se encuentran por fuera del valor de referencia del 70 al 110% considerando que la recuperación ideal es del 100%<sup>8</sup>.

---

<sup>7</sup> Aplicación Metrológica de los Estudios r&R (Repetibilidad y Reproducibilidad)

<sup>8</sup> Tesis Doctoral de Determinación de residuos de fungicidas en productos vegetales mediante técnicas cromatográficas avanzadas realizado en la Universidad de Jaume I, Castellón, España.

- Valores superiores al 100% indican interferencias debido a la matriz que deben eliminarse, recuperaciones menores indican pérdidas de analito durante la preparación de la muestra.
- El valor elevado de la desviación de repetibilidad en stirofos se debe a la ubicación donde se efectúan las mediciones ya que el equipo por su sensibilidad puede detectar este compuesto en el ambiente de trabajo, siendo la ESPE un campus con grandes áreas verdes por lo que requiere continuamente fumigación de todas sus edificaciones con pesticidas organofosforados
- El límite de cuantificación del Ethoprophos es de 0,01mg/Kg y de 0,02 mg/Kg para Clorpirifos, comparados con los valores establecidos por el Codex Alimentarius de 0,02 mg/kg y 2 mg/Kg respectivamente.



## **CAPITULO VII**

### **CONCLUSIONES**

- Los porcentajes bajos de recuperación obtenidos se dieron por pérdidas del analito durante la preparación de la muestra en el proceso de homogenización filtración.
- El empleo de Tolueno en primera instancia presenta resultados con recuperaciones de hasta el 50%, en pruebas posteriores se presenta contaminación de la columna afectando la línea base del cromatograma.
- La variación de las proporciones y volúmenes de solventes no genero altas recuperaciones por lo que se trabajo con las condiciones establecidas en el método original.
- El proceso de homogenización-filtración genera pérdidas de estándar con baja recuperación.
- El empleo de grandes volúmenes de disolvente en la extracción requiere mas tiempo de evaporación alargando el tiempo de tratamiento. Además requiere el uso de disolventes de elevada pureza para evitar contaminaciones.
- Para la curva de calibración se establecieron concentraciones de 0,6ppm, 1ppm, 10ppm y 14ppm las mismas que presentaron linealidad con un factor de correlación de 0,99.

- Los porcentajes del coeficiente de variación de repetibilidad (0,71%) y de reproducibilidad (4,89%) para órgano fosforados totales indican que el sistema de medición se encuentra dentro del rango del 10% de aceptación.
- La gran variación de la repetibilidad en Stirofos se debe a la alta sensibilidad del detector al ambiente.
- Los límite de cuantificación y detección de 0.02 ppm para cada uno, son aplicables para el método en estudio.
- Para el método de análisis de pesticidas órgano fosforados la incertidumbre estándar determinada es de 0,003 mg/kg para un rango de trabajo de 0,02 a 0,5 mg/Kg.

## RECOMENDACIONES

- Es recomendable mejorar el procedimiento de purificación de los extractos ya que en las muestras que contienen grasa, se producen emulsiones en ocasiones difíciles de romper, por lo que es necesario además de centrifugar, filtrar a través de lana de vidrio, añadir sales o pequeñas cantidades de otros disolventes.
- Debido a la pérdida de muestra en el proceso de homogenización y filtración se debe proceder a realizar lavados de todo el material usado en la extracción de pesticidas con el objetivo de recuperar la mayor parte de la muestra.
- Aplicar otras técnicas de extracción como la extracción en fase sólida ya que promueve una disminución en el consumo de disolventes, provoca una menor contaminación ambiental, usa columnas de sílica o florisil mejorando el clean up de la muestra y las condiciones del extracto. Es sencillo, económico y reduce el tiempo del proceso.
- Se recomienda que los reactivos y el material de vidrio que se use para la extracción de pesticidas en banano sea única para el proceso y se mantenga fuera de contacto con cualquier sustancia o con el ambiente ya que esto puede afectar el análisis cromatográfico conduciendo a la elevación de la línea base de los cromatogramas.

- Si la recuperación no es satisfactoria como es el caso de todos los analitos pero es reproducible, cabe la posibilidad de utilizar el método analítico empleando factores de corrección que compensen las pérdidas del analito.
- Es necesario articular todo el esfuerzo posible para fortalecer la capacidad científica y tecnológica de la universidad, que permita minimizar las actuales barreras y promover el desarrollo de técnicas cromatográficas poco estudiadas en el país.

## BIBLIOGRAFIA:

1. Plaguicidas pesticidas, <http://www.tierramerica.net/2002/1201/conectate.shtml>, 2002 (Fecha de Consulta: 22 de Enero 2010)
2. Murcia, A., Stashenko, E. (2008) Determinación de Plaguicidas Organofosforados en vegetales producidos en Colombia, Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias CIBIMOL, Laboratorio de Cromatografía, Bucaramanga. Colombia, Pág. 4.
3. Nuñez, R., El Cultivo del Banano, Programa Nacional del Banano, Ministerio de Agricultura y Ganadería.
4. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO, Departamento de Agricultura, Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas (Versión Revisada), Art. N° 2 “Términos y Definiciones”, Noviembre 2002.. Pág. 11.
5. Albero, María, Determinación de Residuos de Contaminantes Orgánicos en Miel y Zumos, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, 2008
6. Maroto, A., Boqué, R., Riu, J., Rius, F., Cálculo de la Incertidumbre en medidas químicas, Análisis Cromatografico, Instituto de Estudios Avanzados, Departamento de Química Analítica y Química Orgánica Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España.
7. Aplicación Metrológica de los Estudios r&R (Repetibilidad y Reproducibilidad), Metas y Metrólogos Asociados, La Guía Metas, Noviembre 2003
8. Zamora, T., Tesis Doctoral de Determinación de residuos de fungicidas en productos vegetales mediante técnicas cromatográficas avanzadas realizado en la Universidad de Jaume I, Castellón, España, Junio 2004
9. Llamosa, L., Meza L., Botero M., Estudio de repetibilidad y reproducibilidad utilizando el método de Promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad de los Resultados de calibración de acuerdo con la norma técnica NTC-ISO/IEC 17025, Universidad Tecnológica de Pereira, agosto 2007.
10. Codex Alimentarius, [http://www.codexalimentarius.net/web/index\\_es.jsp](http://www.codexalimentarius.net/web/index_es.jsp), Fecha de Consulta: 31 de Marzo del 2011

11. Ley de comercialización y empleo de plaguicidas, codificación, <http://www.agrocalidad.gov.ec/vegetal/LEYCOMERCIALIZACIONEMPLEOPLAGUICIDAS.pdf>, Fecha de Consulta: 31 de Marzo del 2011
12. Bello, X. (2008). USO Y MANEJO SEGURO DE PLAGUICIDAS, Cuenta Reto del Milenio, Nicaragua, León, Managua - León
13. European Food Safety Authority, EFSA “Plaguicidas” (en línea). Topics A-Z., Varios años (Fecha de Consulta: 22 de Enero del 2010). Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/prapertopics/topic/pesticides.html>.
14. Environmental Working Group, EWG, “Insecticides in Children`s Food” (en línea), Shopper`s Guide to Pesticides, 29 de Enero 1998 (Fecha de Consulta: 23 de Enero del 2010). Disponible en: <http://www.ewg.org/featured/437>
15. Ramírez, L. (2009). Determinación de Pesticidas en Vegetales mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de masa/masa (GC-MS/MS), Universidad Tecnológica de la Mixteca, Instituto de Agroindustrias, Laboratorios de Ciencias Químico-Biológicas, Huajuapán de León, Oaxaca, México. Noviembre de 2009.
16. Torres, S., Padilla. P., Bello. X., Arbizú, I. Cartilla del Programa de Capacitación: “Identidad Empresarial y Competitividad en el Mercado. Módulo III Uso Y Manejo Seguro De Plaguicidas, Nicaragua, León, Km. 78 ½ Carretera Managua – León, Mayo, 2008
17. Comisión del Codex Alimentarius, Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, FAO, 00100 Roma, Italia, Sin año (Fecha de Consulta: 22 de Septiembre del 2010) Disponible en: <http://www.fao.org/waicent/faostat/Pest-Residue/pest-s.htm>
18. Aspectos Generales Sobre Los Plaguicidas Y Su Efecto Sobre El Hombre Y El Ambiente, Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá -INCAP- con el apoyo del Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud -ECO/OPS- y la Universidad Estatal a Distancia -UNED-, de Costa Rica. (Fecha de Consulta: 22 de Septiembre del 2010) Disponible en: <http://www.cepis.ops-oms.org/tutorial2/e/unidad1/>
19. Guía del Ciudadano la Extracción con Solventes, Abril 1996), Organismo para la Protección del Medio Ambiente, Desechos Sólidos y Respuesta en Situaciones de Emergencia (5102G), EPA 542-F-96-019, Estados Unidos.

- Selected Alternative and Innovative Treatment Technologies for Corrective Action and Site Remediation: A Bibliography of EPA Information Resources, EPA 542-B-95-001. Bibliografía de publicaciones del EPA sobre técnicas de tratamiento innovadoras.
20. Bautista. A., Benayas. A., Ortiz. A., Cromatografía Principios Y Aplicaciones, Análisis Químico, Ciencia y Tecnología de los Alimentos.
  21. Rosario, 2002. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano, Centro Regional de Investigación y Desarrollo de Rosario. Impreso en Argentina.
  22. Huayamave, S. (2007) Determinación y Evaluación de Plaguicidas Residuales en Banano Ecuatoriano de Consumo en la Ciudad de Guayaquil en el Marco de Seguridad Alimentaria, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, Escuela Superior Politécnica del Litoral.
  23. Ministerio de Salud Pública, MSP, Programa Nacional de Capacitación para el Uso y Manejo Seguro de Productos Fitosanitarios, Curso de Capacitación sobre el Uso Racional de Plaguicidas, Productos Biológicos y Nutrientes de las Plantas, Agosto, Ecuador.
  24. Colaboradores Toxicología y Química Legal “Plaguicidas” (en línea). Guía de Seminarios, Sin año (Fecha de Consulta: 23 de Enero del 2010). Disponible en: [http://www.biol.unlp.edu.ar/toxicologia/seminarios/parte\\_2/plaguicidas.html](http://www.biol.unlp.edu.ar/toxicologia/seminarios/parte_2/plaguicidas.html)
  25. Ministerio de Salud Pública, “Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico” (en línea), Centro de información y Asesoramiento Toxicológico, 2009 (Fecha de Consulta: 25 de Enero del 2010). Disponible en: [http://www.msp.gov.ec/index.php?option=com\\_content&task=view&id=504&Itemid=84](http://www.msp.gov.ec/index.php?option=com_content&task=view&id=504&Itemid=84)
  26. A.I. Valenzuela-Quintanar, R. Armenta-Corral, E. Moreno-Villa, L. Gutiérrez-Coronado, P. Grajeda-Cota y C. Orantes-Arenas. (2006) Optimización y validación de un método de dispersión de matriz en fase sólida para la extracción de plaguicidas organofosforados en hortalizas, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). México. Enero 2006, Pág. 5 – 6
  27. Colaboradores de TIERRAMERICA “Plaguicidas, Pesticidas” (en línea). Medio Ambiente y Desarrollo, 2002 (Fecha de Consulta: 22 de Enero

- 2010). Disponible en:  
<http://www.tierramerica.net/2002/1201/conectate.shtml>.
28. Colaboradores Ecuador Inmediato “Los Pesticidas dejan Secuelas en el eje Bananero” (en línea), Economía, 4 de Enero 2009 (Fecha de Consulta: 25 de Enero del 2010). Disponible en:  
[http://www.ecuadorinmediato.com/Noticias/news\\_user\\_view/ecuadorinmediato\\_noticias--94756](http://www.ecuadorinmediato.com/Noticias/news_user_view/ecuadorinmediato_noticias--94756)
29. Departamento de Química Analítica, Preparaciones Básicas en Análisis Químico, Farmacéutico y Medioambiental, Guías Multimedia del GAMM, Universidad de Valencia.  
<http://www.uv.es/gammm/Subsitio%20Operaciones/3%20material%20de%20uso%20frecuente%20COMPLETO.htm>,
30. La mejor manera - Procedimiento de lavado eHow.com cristalería de laboratorio  
[http://translate.googleusercontent.com/translate\\_c?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://www.ehow.com/way\\_5331965\\_procedure-washing-laboratory-glassware.html&rurl=translate.google.com.ec&usg=ALkJrhgBeM0ijZea0OCxCvJKBRVhec-0Pg#ixzz0x0HYIs9K](http://translate.googleusercontent.com/translate_c?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://www.ehow.com/way_5331965_procedure-washing-laboratory-glassware.html&rurl=translate.google.com.ec&usg=ALkJrhgBeM0ijZea0OCxCvJKBRVhec-0Pg#ixzz0x0HYIs9K)
31. Clasificación y Toxicidad de los Plaguicidas, Instituto Nacional de Salud, Subdirección de Vigilancia y Control, Primer semestre de 2007.
32. Resabala, C., Evaluación de la Banana Ecuatoriana de acuerdo con Estándares Internacionales de Seguridad Alimentaria, para Garantizar su Certificación y Fortaleza Competitiva, Laboratorio de Cromatografía del Instituto de Ciencias Químicas y Ambientales, Escuela Politécnica Superior del Litoral, Octubre 2005.
33. Marín U., Adame S., Díaz N., Gutiérrez J., Vázquez M., Ramírez J., Evaluación preliminar de la presencia de pesticidas organoclorados en pescados de la presa Vicente Guerrero, Ciencia y Tecnología Alimentaria, Tamaulipas, México, 2008.
34. Requerimientos de Toma de Muestras y Preservación: Líquidos, Sólidos, Gases, Materias Primas y Alimentos, Instituto de Salud Pública de Chile.
35. Directrices sobre la Estimación de la Incertidumbre de los resultados, CAC/GI 59-2006, Codex Alimentarius.



36. Métodos de muestreo recomendados para la determinación de residuos plaguicidas a efectos de cumplimiento de los LMR, CAC/GL 33-1999, Codex Alimentarius.
37. Directrices sobre la Incertidumbre en la medición, CAC/GL 54-2004, Codex Alimentarius.
38. Parte del producto a la que se aplican los límites máximos del codex para residuos y que se analiza, CAC/GL 41-1993, Codex Alimentarius.
39. Directrices sobre buenas prácticas en el análisis de residuos de plaguicidas, CAC/GL 40-1993, Rev. 1-2003, Codex Alimentarius.