

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE RESIDUALIDAD DE PLAGUICIDAS EN GULUPA (*Passiflora edulis f. edulis*)^a

VALIDATION OF A METHOD FOR PESTICIDE RESIDUE ANALYSIS IN GULUPA (*Passiflora edulis f. edulis*)

SARA JULIANA OLIVO TABORDA^b, JUAN DAVID ECHEVERRI RUIZ^c

Recibido 14-03-2016, aceptado 31-05-2016, versión final 30-06-2016.

Artículo Investigación

RESUMEN: La gulupa perteneciente a la familia *Passifloraceae*, es nativa del trópico americano, y se caracteriza por su exótico y distintivo aroma, cualidad que la hace atractiva para el mercado europeo, para lo cual debe de cumplir estándares de inocuidad sanitaria. Para ello, se evaluó un método para el análisis simultáneo de residualidad de metil-paration, malation, deltametrina y clorotalonilo en esta matriz. Se aplicó la técnica de QuEChERS, siguiendo una modificación del protocolo EN 15662, formado por tres etapas, la primera, consiste en una extracción con acetonitrilo (MeCN) que incluye un proceso de precipitación salina de la muestra en medio acuoso. En el segundo paso, se realiza una limpieza utilizando diversos sorbentes para remover la mayoría de componentes coextraídos con los analitos, y por último se realiza el análisis instrumental empleando la cromatografía gaseosa μ ECD. En el análisis de linealidad se obtuvieron correlaciones de 0.9991; 0.9998 y 0.9992 para metil-paration, malation y deltametrina respectivamente; que cumplieron las pruebas de significancia, residuales, pendiente e intercepto. Se lograron límites de cuantificación de 0,035 mg/kg para metil-paration y 0,02 mg/kg para los otros dos compuestos, todos con estimaciones de incertidumbre menores al 50%. Además cumplieron los criterios de reproducibilidad y recuperación establecidos en SANCO, 12571 (2013), logrando una validación exitosa para estos 3 plaguicidas pues clorotalonilo no cumplió con los parámetros de linealidad y límite de cuantificación requeridos para ser aprobado.

PALABRAS CLAVE: Validación, análisis de residualidad, *Passiflora edulis f. edulis*, plaguicidas, QuEChERS.

ABSTRACT: The gulupa belongs to the family *Passifloraceae*, it is native to the American tropics and it is characterized by its exotic and distinctive aroma, quality that makes it attractive for the European

^aOlivo Taborda, S.J. & Echeverri Ruiz, J.D. (2016). Validación de un método para el análisis de residualidad de plaguicidas en gulupa (*passiflora edulis f. edulis*). *Revista de la Facultad de Ciencias*, 5 (1), 170–183. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.fac.cienc.v5n1.56185>

^bPracticante Ingeniería Biológica: Escuela de Biociencias, Universidad Nacional de Colombia, Calle 59A No 63 20 Medellín, Colombia. sjolivot@unal.edu.co

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

market, which must meet standards of harmless. To do this, a method was evaluated for the simultaneous analysis of residual effect of methyl-parathion, malathion, deltamethrin and chlorothalonil in this matrix. The QuEChERS skill was applied following a modification of the protocol EN 15662 formed by three stages, the first one consists of a removal with acetonitrile (MeCN) that includes a process of saline precipitation of the sample in aqueous medium. In the second step, a cleanliness is made using diverse sorbents to remove most of components coextracted with the analytes and finally, the instrumental analysis is realized using the gaseous chromatography μ ECD. In the analysis of linearity was obtained correlations of 0,9991; 0,9998 and 0,9992 for methyl-parathion, malathion and deltamethrin respectively; which fulfilled the significance tests, residual, slope and intercept. There were achieved limits of quantification of 0,035 mg/kg for methyl-parathion and 0,02 mg/kg for the other two compounds were achieved, all of them with uncertainty estimates less than 50 %. In addition, they fulfilled the criteria of accuracy and precision established in SANCO, 12571 (2013), achieving a successful validation for these three pesticides although chlorothalonil did not comply with the parameters of linearity and limit of quantification required to be approved.

KEYWORDS: Validation, pesticide residue analysis, *Passiflora edulis f. edulis*, pesticides, QuEChERS.

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia de los microorganismos y su rápida mutación han provocado un incremento en el uso de plaguicidas, como forma efectiva de erradicación de un amplio espectro de plagas que afectan diferentes cultivos de consumo humano e interés industrial (Romero & Gonzalez, 2010). Tradicionalmente, el uso de estas sustancias químicas de forma indiscriminada desencadenan afectaciones en la salud humana y problemas ambientales relacionados con la contaminación de aguas y suelos, y la posterior disminución de biodiversidad (Jiménez *et al.*, 2010; Paz *et al.*, 2015).

Debido a que Colombia, en los últimos años, ha experimentado una apertura económica en el sector agrícola, en términos de exportaciones de frutas, es necesario que cumpla con los requerimientos mínimos de inocuidad disminuyendo los riesgos microbiológicos, residuos de plaguicidas, utilización inadecuada de los aditivos alimentarios, contaminantes químicos (incluidas las toxinas biológicas) y la adulteración de los productos procesados, los cuales permiten satisfacer los requerimientos que exige el mercado, liderado actualmente por Europa (Ahumada *et al.*, 2012) (España & Guerrero, 2014). El cumplimiento de los mismos contribuirá con la disminución de las pérdidas por problemas fitosanitarios que actualmente son alrededor del 40 % en cultivos de la familia Passifloraceae (MADR, 2009). Para el caso de gulupa, los principales clientes son Alemania, Países Bajos, Reino Unido y Bélgica con ventas cercanas a los 1.700.000 de dólares en 2007 y hasta 4.100.000 de dólares en 2008 (Proexport Colombia, 2011).

La inocuidad de los productos frescos es asegurada mediante legislaciones internacionales, a través de organismos como el Codex Alimentarius y European Food Safety Authority (EFSA). Para permanecer en el mercado, Colombia debe acoplarse a estas legislaciones y realizar los análisis

de cada parámetro de control contemplado en ella. El análisis de residualidad de plaguicidas es uno de los parámetros que debe ser evaluado, pues permite diagnosticar la eficiencia de las prácticas agrícolas llevadas a cabo por los agricultores, de modo tal que se pueda promover el uso adecuado de los plaguicidas, como se estipula en el CONPES 3514 del 2008.

Esta exportación dinámica de frutas está muy ligada a las especies frutales exóticas debido a que son innovadores y exhiben excelentes cualidades nutricionales y sensoriales, dentro de las cuales se destaca la gulupa; nativa del trópico americano y caracterizada por contener en el interior gran cantidad de semillas rodeadas por una pulpa amarilla gelatinosa, que muestra un intenso aroma y sabor dulce-ácido. Se ha comprobado que estos frutos contienen vitamina A, tiamina, riboflavina, niacina, calcio, fósforo, y ácido ascórbico (Jiménez *et al.*, 2010; España, 2013).

El laboratorio de análisis de aguas de Cornare, en aras de ampliar el portafolio de servicios se encuentra en el proceso de implementación de análisis de otras matrices diferentes al agua, entre ellas los productos agrícolas del oriente antioqueño, buscando el cumplimiento de los límites máximos de residuos de plaguicidas establecidos por el Codex Alimentarius a nivel internacional y el CONPES 3514 del 2008, a nivel nacional.

El método QuEChERS, acrónimo en inglés de Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust and Safe, desarrollado por Anastassiades y colaboradores en 2003, se caracteriza por la disminución de solventes y reactivos usados en el procedimiento y la facilidad del tratamiento de las muestras, particularidades que recientemente, han llevado a este método a extenderse para determinar otros contaminantes incluidos cresoles, benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y bifenilos policlorados (PCB) (Domínguez *et al.*, 2014; Norli *et al.*, 2011; Tuzimski & Rejczak, 2014), en los que se exploran otras matrices diferentes a los productos frescos alimenticios tales como agua, suelo y muestras biológicas (Norli *et al.*, 2011). Éste se constituye de una extracción, limpieza y análisis instrumental empleando cromatografía gaseosa acoplada a detector de microcaptura de electrones (GC- μ ECD) para este caso (Oliveira *et al.*, 2014). Sin embargo, el análisis instrumental se puede realizar por cromatografía de gases acoplada a un detector de masas o por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Godula *et al.*, 1999). En el presente trabajo, la validación del método estuvo regida por el documento SANCO 12571,2013 de la dirección general de salud y consumidores de la Unión Europea, mediante el uso de parámetros de linealidad, reproductibilidad, repetibilidad, efecto matriz, límites de cuantificación y estimación de incertidumbre; que dieron como resultado la validación de malation, metil-paration y deltametrina. La estructura planar de clorotalonil, le confiere sensibilidad e inestabilidad a cambios mínimos de pH, lo cual provoca que el procesamiento de la muestra esté sujeto a acidificaciones del medio, con el fin de proteger el analito. Esta misma precaución es necesaria para plaguicidas organoclorados, en general. Asimismo, el uso de carbón grafitado debe de ser limitado ya que retiene compuestos polares de similar reactividad química que este plaguicida (Hill *et al.*, 2000; Bourdon, 2002).

2. METODOLOGÍA

2.1. Materiales y reactivos

La cuantificación de plaguicidas en productos frescos por el método QuEChERS, supone por lo general tres etapas: la primera, consiste en una extracción con acetonitrilo (MeCN) que incluye un proceso de precipitación salina con sulfato de magnesio (MgSO₄) y cloruro de sodio (NaCl), en medio acuoso. En el segundo paso, se realiza un procedimiento de limpieza utilizando diversos sorbentes para remover la mayoría de componentes coextraídos con el analito, que recibe el nombre de extracción en fase sólida dispersiva, y por último se realiza el análisis instrumental empleando la cromatografía gaseosa acoplada a detector de microcaptura de electrones (GC- μ ECD) en este caso (Oliveira *et al.*, 2014).

Como matriz se utilizaron frutos de gulupas adquiridas en la plaza de mercado de la mayorista de la ciudad de Medellín y fueron almacenadas a -25°C. Los estándares de plaguicidas usados fueron AccuStandard ®, de los que se prepararon soluciones madre de metil-paration y malation en acetonitrilo, deltametrina en acetona y clorotalonilo en tolueno; todas de concentraciones de 1000 mg/kg, necesarias para la construcción de las curvas de calibración de cada plaguicida que se encuentran en un intervalo de 0.010-2.244 mg/kg. Las soluciones se almacenaron a -25°C. Se usaron los solventes grado cromatografía, acetonitrilo Merck® y, acetona de Merck ®. En la preparación de la muestra se utilizaron kits QuEChERS marca Restek ®, para la extracción se empleó el paquete Q110 que contiene 4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g Na₃C₆H₅O₇ * 2H₂O, 0,5 g Na₃C₆H₅O₇ * 1, 5H₂O. Para la limpieza se empleó el paquete # cat. 26222 Restek ® que contiene 1200 mg MgSO₄, 400 mg amina secundaria primaria (PSA), 400 mg carbón negro grafitado (GCB), 400 mg C18. Para el procedimiento con clorotalonilo, se usó como sales de extracción QuEChERS (6 g MgSO₄, 1.5 g NaOAc, # cat. 26238, Q150 Restek®); además del kit de limpieza QuEChERS (900 mg MgSO₄, 150 mg PSA, 15 mg GCB, # cat. 26224 Restek ®). Para las mediciones volumétricas se utilizó vidriería Brand® clase A.

2.2. Preparación de la muestra

Se implementó una versión modificada del protocolo inicial, conocido bajo el nombre EN 15662; de lo cual se siguió el siguiente procedimiento.

Primera etapa: extracción

1. En esta etapa de extracción se busca eliminar la mayor cantidad de agua posible y mantener el pH estable para minimizar la degradación de los plaguicidas. De la mezcla previamente homogenizada se toman 10 g y se llevan a un tubo falcón de 50 mL.
2. Después agregar 10 mL de acetonitrilo grado reactivo y agitar vigorosamente por un minuto.

3. Agregar sales de extracción (4 g $MgSO_4$, 1 g $NaCl$, 1 g $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$, 0,5 g $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 1,5H_2O$), y agitar vigorosamente por un minuto; guardar los tubos de teflón en el congelador por al menos 5 minutos.

Si el pH después de agregar las sales es menor a 3, adicionar aproximadamente entre 500 y 600 μL de $NaOH$ 6N o hasta llegar a un pH entre 5 y 5.5.

4. Centrifugar por 5 minutos a 5000 rpm, para separar la fase inorgánica de la orgánica.

Segunda etapa: limpieza (dSPE)

Es la extracción dispersiva en fase sólida y limpieza, donde se elimina agua y otras interferencias de la matriz como ceras, grasas, azúcares y pigmentos (carotenoides y clorofila).

1. Transferir 4 mL del sobrenadante a un tubo dSPE que contiene 1200 mg $MgSO_4$, 400 mg PSA, 400 mg GCB, 400 mg C18, y agitar por 2 minutos.
2. Centrifugar por 5 minutos a 5000 rpm, para separar el material sólido del solvente acetonitrilo.
3. Finalmente, transferir un 1 mL a un vial de cromatografía.

Tercera etapa: análisis del extracto final

1. Analizar por cromatografía gaseosa utilizando un cromatógrafo de gases acoplado con detector de micro-captura de electrones (GC- μ ECD) con las condiciones descritas en la Tabla 1.

2.3. Equipos e instrumentos

En la preparación de estándares se empleó una balanza analítica de precisión Sartorius® modelo CP225D (resolución 0.00001 g). Para pesar la muestra se usó la balanza Ohaus ®NOB110 (resolución 0.1 g). Durante extracción y limpieza se emplearon la centrífuga Qsep 3000 Restek. En la determinación cromatográfica se empleó el equipo Agilent ®7890 A y para cuantificación de áreas y análisis de cromatogramas se usó el software Open Lab ChemStation versión 01.05, las condiciones en las cuales se operó el equipo se describe en la Tabla 1.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Validación del método

El control analítico fue llevado a cabo mediante el seguimiento de los parámetros de linealidad, efecto matriz, límites de cuantificación, porcentajes de recuperación, repetibilidad, reproducibilidad y estimación de incertidumbre en la medición propuestos en SANCO, 12571 (2013) de la Unión Europea (Montaño & Guerrero, 2001; Moreno & Guerrero, 2002). En la Figura 1 se muestra los cromatogramas para la identificación de los tiempos de retención de los plaguicidas estudiados, y para la caracterización de sus respectivos picos.

Tabla 1: Condiciones de operación del cromatógrafo Agilent ®7890

| Parámetro | Condición |
|----------------------|---|
| Horno | Inicia en 100°C durante 2 min Rampa 1: 12° C/min hasta 200°C Rampa 2: 10° C/min hasta 280°C durante 5 min Tiempo total de corrida 23 min |
| Flujo de N2 | 30 mL/min a 6.5 psi |
| Columna | 30 m*0,32 mm*0.25 µm Agilent J&W HP-5 1909J-413 |
| Temperatura inyector | 240°C |
| Temperatura detector | 300°C |
| Presión de pulso | 40 psi durante 0.4 min |
| Modo de inyección | Splitless 2 µL. Purga al 1min |
| Detector | µECD T°: 300°C Flujo: 30 mL/min Señal: 5 Hz/0,04min |

Tabla 2: Datos de linealidad de los plaguicidas evaluados

| Plaguicida | Pendiente | Intercepto | R ² |
|----------------|-----------|------------|----------------|
| Metil-paration | 99587.1 | -775.7 | 0.9991 |
| Malation | 132019.7 | -687.5 | 0.9998 |
| Deltametrina | 119119.1 | 434.2 | 0.9992 |
| Clorotalonilo | 238485.2 | -1103.7 | 0.9923 |

3.1.1. Análisis de linealidad

En la Tabla 2 se muestra que todos los plaguicidas cumplen con los requerimientos necesarios para asegurar que tienen un comportamiento lineal, a excepción de clorotalonilo, que sobrepasa con un 6.5% el coeficiente de variación de la prueba de la pendiente (SANCO, 12571, 2013), de acuerdo a Michael y colaboradores en el 2011, se puede atribuir este comportamiento al uso de GCB (carbón grafitado), pues este elemento tiene la capacidad de retener compuestos y pigmentos polares, como los plaguicidas de estructura planar (clorotalonilo) y por ello su uso debe de ser estrictamente necesario para matrices con gran cantidad de pigmentos y no sobrepasar 7.5 mg GCB por 1mL de extracto; luego la retención por medio del GCB, no tiene un comportamiento lineal, y a su vez el chlorothalonil, tampoco. Por lo tanto este plaguicida no cumple con los requisitos de linealidad (Anastassiades *et al.*, 2003; Michael *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2008).

3.1.2. Efecto matriz

En la Figura 2 se muestra el efecto matriz de cada uno de los plaguicidas, mediante la comparación de las curvas realizadas sobre la matriz gulupa (roja) y sobre solvente (azul). El porcentaje calculado representa la cantidad de compuestos que hacen parte de la matriz que participan como

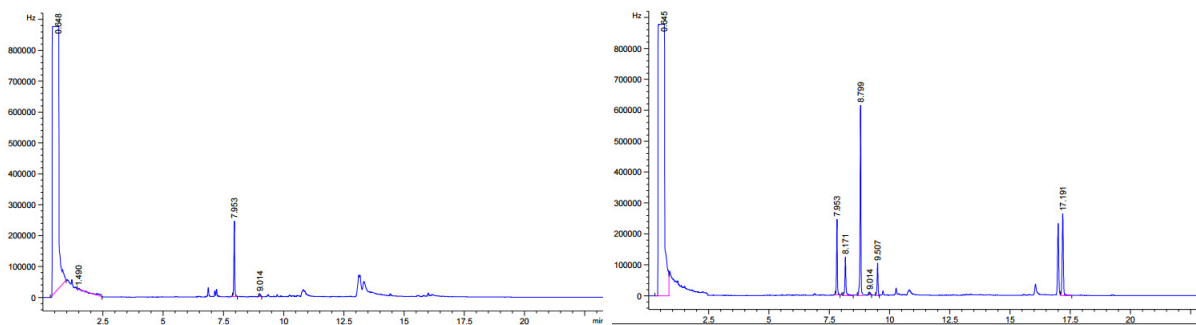


Figura 1: Cromatogramas GC- μ ECD (Hz vs min). A la derecha, muestra de gulupa libre de plaguicidas con los picos característicos de la matriz. A la izquierda, muestra de gulupa enriquecida con 2,244 mg/kg, 1,665mg/kg, 1,419 mg/kg y 1,508 mg/kg para metil-paration (8,799 min), malation (9,507 min), deltametrina (17,190 min) y clorotalonilo (8,170 min), respectivamente.

Tabla 3: Modelo de validación para el parámetro de límite de cuantificación

| Plaguicida | Límite de cuantificación obtenido | Coefficiente de variación | Porcentaje de error | LRM |
|----------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------|------------|
| Metil-paration | 0.035 mg/kg | 9.7% | 12.9% | 0.2 mg/kg |
| Malation | 0.020 mg/kg | 5.2% | 14.2% | 0.02 mg/kg |
| Deltametrina | 0.022 mg/kg | 5.6% | 0.6% | 0.2 mg/kg |
| Clorotalonilo | 0.01 mg/kg | 3.8% | 64.4% | 0.01 mg/kg |

interferencias, y no fueron retirados de forma efectiva en los procesos de limpieza a los que es sometida la muestra y no permiten una mejor detección y cuantificación de los compuestos de interés analítico (Lehotay *et al.*, 2010); este hecho es más significativo en el plaguicida malation con un porcentaje de efecto matriz de 486.8 %, lo cual indica un efecto matricial prominente mientras que metil-paration, deltametrina y clorotalonilo, cuentan con 101.3 %, 30.1 %, 42.3 %, respectivamente, que representa que no hay efecto matricial sobre metil-paration, entre tanto para deltametrina y clorotalonilo existe un efecto represivo (Domínguez *et al.*, 2014; Ahumada *et al.*, 2012). Existen compuestos que inducen el efecto matriz tales son los casos de acefato, malation, dimetoato y pirazofos, conocidos por su gran sensibilidad a procesos de adsorción en el vaporizador del inyector (Hajlová & *et al.*, 1998). Sin embargo, la naturaleza de pigmentación de la gulupa debido a la presencia de carotenoides, podría contribuir a este tipo de efecto sobre el análisis de plaguicidas (Benitez & Solange, 2010), aunque no resulta conveniente concluir a partir de esto ya que es necesario realizar más estudios con los que se pueda corroborar este hecho. En SANCO 12571, 2013, se recomienda diferentes métodos para disminuir el efecto matriz, en los que sobresale la adición de sustancias que protejan el analito como la glucolactona, el sorbitol, o 3-metoxi-1,2-propanodiol, siendo la opción ideal para la atenuación de este efecto el uso del método de estándar interno, dado que elimina variaciones sobre las diferencias que pueda existir sobre las muestras de los lotes obtenidos de gulupa.

Tabla 4: Porcentajes de recuperación a diferentes niveles de concentración de plaguicidas.

| Plaguicida | Nivel bajo | Nivel medio | Nivel alto |
|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Metil-paration | 0.035 mg/kg 87.0 % | 0.5611 mg/kg 115.2 % | 1.1222 mg/kg 105.9 % |
| Malation | 1.1222 mg/kg 114.2 % | 0.2082 mg/kg 106.9 % | 0.8327 mg/kg 97.5 % |
| Deltametrina | 0.022 mg/kg 99.4 % | 0.355 mg/kg 101.9 % | 0.7095 mg/kg 97.1 % |
| Clorotalonilo | 0.010 mg/kg 164.4 % | 0.1885 mg/kg 90.5 % | 0.7538 mg/kg 97.9 % |

3.1.3. Límite de cuantificación

Los resultados de este parámetro consignados en la Tabla 3, demuestran la sensibilidad de las metodologías usadas para la determinación de la residualidad de plaguicidas en gulupa, los límites de cuantificación obtenidos se encuentran por debajo del límite máximo de residuos establecidos por las legislaciones internacionales. En Colombia la resolución 2906 de 2007, no establece los LMR (límite máximos de residuos) para los plaguicidas estudiados sobre los cultivos de gulupa, pero en European Food Safety Authority 2014, están estipulados para cultivos de pasifloras. Además, se observa que clorotalonilo, al no cumplir con los criterios de linealidad, la obtención del límite de cuantificación no es menor que el LMR que se tiene para ese plaguicida, luego este compuesto no se pudo validar.

3.2. Reproducibilidad

La evaluación de este parámetro fue realizada con base al límite de cuantificación y de los estudios de recuperación realizados a partir del procesamiento y análisis de tres réplicas de cada nivel, de los cuales se resaltan los porcentajes de error menores del 20 % (SANCO, 12571, 2013). En la Tabla 3 muestra que el clorotalonilo sobrepasa el valor estipulado, indicando que este plaguicida no se comportará de la misma forma por el método de extracción elegido para su estudio. Los demás plaguicidas cumplen con el parámetro.

3.3. Recuperación

Los ensayos realizados por triplicado en la matriz gulupa, a niveles bajo, medio y alto de concentración se compararon con sus análogos en la curva de calibración. Estos porcentajes de recuperación deben estar entre 70-120 % (SANCO, 12571, 2013) para que dicho parámetro sea válido. Con los resultados de recuperación obtenidos se realizó una prueba con estadístico G de Cochran. Dado que casi todos los parámetros estudiados dependen del comportamiento lineal del plaguicida, el clorotalonilo no cumple con la precisión exigida para el nivel bajo, como se observa en la Tabla 4.

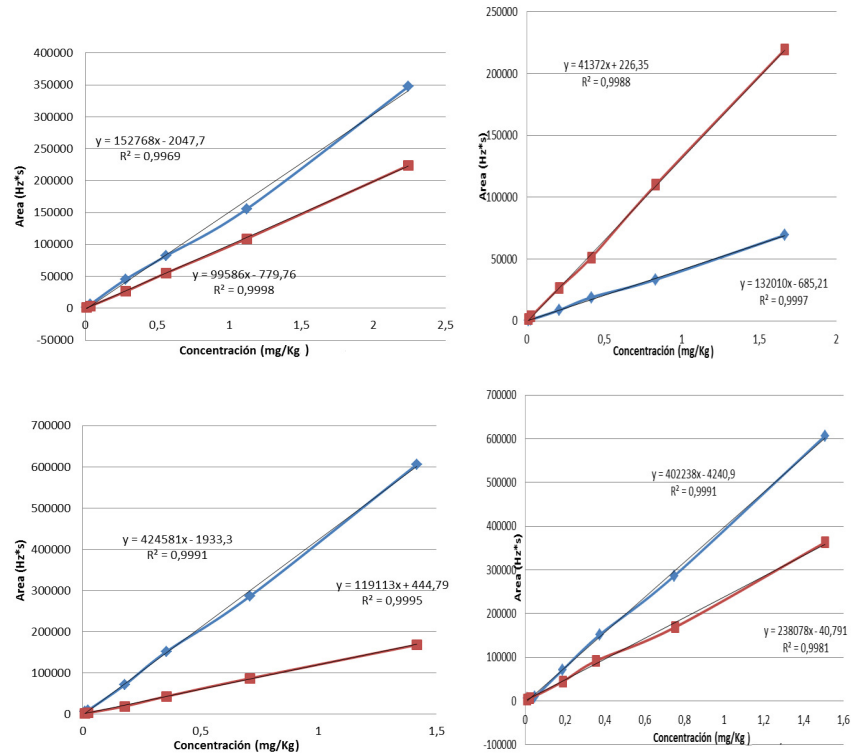


Figura 2: Efecto matriz de cada plaguicida. A. Metil-paration. B. Malation. C. Deltametrina. D. Clorotalonilo. Puntos azules plaguicidas en solvente, en rojo los plaguicidas en la matriz gulupa.

3.3.1. Repetibilidad

Este parámetro fue evaluado en los mismos niveles de concentración que en el anterior, bajo las condiciones de repetibilidad y precisión expresada en términos de coeficientes de variación; para observar la dispersión de datos, que no deben superar el 20 %, por lo que se procesaron tres réplicas de cada nivel como se observa en la Tabla 3. En general, se observó que la dispersión de los resultados de los plaguicidas en la matriz gulupa tiende a aumentar en los niveles medios para clorotalonilo, deltametrina y malation, mientras que para metil-paration esta dispersión aumenta conforme disminuye la concentración, como se puede apreciar en la Tabla 5.

3.3.2. Incertidumbre

Se tiene como principales fuentes de incertidumbre, el peso de los estándares, preparación de estándares y dilución de los mismos, regresión de la curva de calibración y calibración de equipos. El cálculo de estas incertidumbres fueron realizadas por la metodología Eurachem para la validación de métodos analíticos (Ellison & Williams, 2012)

Para el valor estimado intermedio de 0.2805 mg/kg, 0.4164 mg/kg, 0.355 mg/kg y 0.3769 mg/kg

Tabla 5: Precisión expresada en coeficientes de variación (%) a diferentes niveles de concentración de plaguicidas.

| Plaguicida | Nivel bajo | Nivel medio | Nivel alto |
|----------------|--------------|--------------|--------------|
| Metil-paration | 0.035mg/kg | 0.5611 mg/kg | 1.1222 mg/kg |
| | 9.7 % | 6.2 % | 4.2 % |
| Malation | 1.1222 mg/kg | 0.2082 mg/kg | 0.8327 mg/kg |
| | 5.2 % | 8.6 % | 8.8 % |
| Deltametrina | 0.022 mg/kg | 0.355 mg/kg | 0.7095 mg/kg |
| | 5.6 % | 7.5 % | 0.7 % |
| Clorotalonilo | 0.010 mg/kg | 0.1885 mg/kg | 0.7538 mg/kg |
| | 3.8 % | 20.9 % | 0.6 % |

para metil-paration, malation, deltametrina y clorotalonilo, respectivamente, en que todas las incertidumbres cumplen con dicho criterio, pues no superan el 50 %, como se muestra en la Tabla 6.

4. CONCLUSIONES

El protocolo EN 15662 modificado es efectivo para la cuantificación de los plaguicidas metil-paration, malation y deltametrina pues cumplieron con los criterios de validación exigidos por European Food Safety Authority, 2014. Resultados similares obtuvieron Golge y Kabak en el 2015, en el que hicieron ensayos usando el método AOAC 2007, 01 en pulpas de naranjas. Paz *et al.* (2015) reporta excelentes resultados para análisis de plaguicidas organoclorados en tamarindo, lo cual lleva a concluir que la naturaleza ácida de la matriz no incide negativamente en el proceso de extracción, no obstante, es necesario hacer seguimiento al pH.

Para clorotalonilo es importante tener en cuenta la estructura planar que posee, para que el proceso de validación dé mejores resultados y pueda ser validado en próximas investigaciones, por lo tanto este protocolo modificado no es adecuado para la cuantificación de este plaguicida. No se puede descartar la metodología de adición de estándar pues Lehotay *et al.*, en el 2015, reportaron buenos resultados para la cuantificación de este compuesto en manzanas, duraznos y limones. Sin embargo, existe la metodología de estándar interno que podría funcionar satisfactoriamente para este tipo plaguicidas. En general, la aplicación del estándar interno contribuye en la disminución del efecto matriz debido a que corrige las variaciones que se puedan presentar durante el procesamiento de la muestra y por diferencias intermatriz, siendo ésta la forma ideal de mejorar el desempeño de dicho criterio.

No existen datos en la literatura con respecto a la presencia de residuos de plaguicidas en la pulpa de gulupa, lo cual hace esta investigación novedosa y pertinente. Los resultados del presente estudio son similares a los reportados en estudios anteriores para la detección de residuos de plaguicidas en diferentes tipos de jugos de frutas (Albero *et al.*, 2003; Gilbert-López *et al.*, 2007; Picó &

Tabla 6: Resumen de parámetros necesarios para la validación con sus respectivos valores para cada plaguicida. Metil-paration(MP), Malation (M), Deltametrina (D), Clorotalonilo (C).

| Parámetro | Modo y Criterio | Resultado de Criterio |
|--------------------------|--|-----------------------|
| Linealidad | -A través de la curva calibración. -Coeficiente de variación < 5% | MP : 1.4 % |
| | | M : 1.0 % |
| | | D : 2.5 % |
| | | C : 6.4 % |
| Efecto matriz | -Comparación de la respuesta de los estándares en solventes y sobre la matriz gulupa. -Efecto matriz % | Ver Tabla 2 |
| | | MP : 101.3 % |
| | | M : 486.8 % |
| | | D : 30.1 % |
| Límite de cuantificación | -Por definición: nivel más bajo donde los criterios de veracidad y precisión se cumplen. -≤ LMR %CV < 15 % | C : 42.3 % |
| | | Ver Figura 1 |
| | | MP : 0.035mg/kg |
| | | M : 0.020mg/kg |
| Reproducibilidad | -A partir de los mismos ensayos para el límite de cuantificación -Error < 20 % | D : 0.022mg/kg |
| | | C : 0.01mg/kg |
| | | Ver Tabla 3 |
| | | MP : 12.9 % |
| Exactitud | -Determinar el promedio de recuperación para los niveles bajo, medio y alto - % recuperación 70 – 120 % | M : 14.2 % |
| | | D : 0.5 % |
| | | C : 64.3 % |
| Precisión | -Determinar repetibilidad para los niveles bajo medio y alto, por triplicado -≤ 20 % | Ver Tabla 3 |
| | | Ver Tabla 5 |
| Incertidumbre | -Medir las incertidumbres directas para calcular la incertidumbre global por el método de botton up -U(g)50 % | MP : 24.0 % |
| | | M : 18.7 % |
| | | D : 13.3 % |
| | | C : 14,3 % |

Kozmutza, 2007; Rawn *et al.*, 2004; Tadeo *et al.*, 2004).

Referencias

Ahumada, D., Aparicio, L., Fuentes, J., Guerrero, J. & Checa, B. (2012). Comparación de dos aproximaciones para la estimación de la incertidumbre en análisis de residuos de plaguicidas mediante cromatografía de gases. *Revista Colombiana de Química*, 41(3), 377–394.

Albero, B., Sánchez-Brunete, C., & Tadeo, J. L. (2003). Determination of endosulfan isomers and endosulfan sulfate in tomato juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1007, 137–143.

Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D. & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction”for

- determination of pesticide residue in produce. *Journal of AOAC*, 86, 412–431.
- Benitez, H., Solange, V. (2010). Caracterización del agente etiológico de la enfermedad denominada “mancha de aceite” en cultivos de gulupa (*Passiflora edulis*) en zonas productoras en Colombia. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Bourdon, R.D. (2002). Evaluación de la residualidad de plaguicidas en uchuva (*Physalis peruviana* L.) en el departamento de Cundinamarca. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- CONPES, 3514. (2008). Política nacional fitosanitaria y de inocuidad para las cadenas de frutas y de otros vegetales. Agosto 2015. República de Colombia, Departamento Nacional de Planeación. Sitio web: <http://www.ica.gov.co/getattachment/b12bfeda-1f37-4266-9c0c-e5c9e96be7bf/2008CN3514.aspx>
- Domínguez, A., Placencia, F., Cereceda, F., Fadic, X. & Quiroz, W. (2014). Analysis of tomato matrix effect in pesticide residue quantification through QuEChERS and single quadrupole GC/MS. *ChileanJar*, 74(2), 148–156.
- Ellison, S. & Williams, A. (2012). Quantifying uncertainty in analytical measurement. Julio 2015. EURACHEM/CITAC Guide CG 4. Sitio web: <http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012 P1.pdf>
- España, J. C. & Guerrero, J. A. (2014). Comparison of QuEChERS official methodologies for the analysis of pesticide residues on Colombian fruit by GC-MS. *Food Additives & Contaminants*, 31, 678–687.
- España, J. C. (2013). Análisis de residuos de plaguicidas en frutas colombianas de exportación y cereales. *Revista de Química Colombiana*, 50(1), 48–61.
- FAO, CODEX STAN 12. 1981. Julio 2015. Sitio web: http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.dolang=es.
- Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., Mezcuca, M., Molina-Díaz, A., & Fernández-Alba, A. R. (2007). Determination of postharvest fungicides in fruit juices by solidphase extraction followed by liquid chromatography electrospray time-of-eight mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10548–10556.
- Godula, M.; Haslova, J. & Katerina, A. (1999). Pulsed splitless injection and the extent of matrix effects in the analysis of pesticides. *J. High Resol. Chromatogr.* 22, 395–402.
- Golge, O. & Kabak, B. (2015). Determination of 115 pesticide residues in oranges by high-performance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry in combination with QuEChERS method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, 86–97.

- Hajlová, J., Holadová, K., Kocourek, V., Poustka, J., Godula, M., & Cuhra, P. (1998). Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. *J Chromatogr A.*, 800(2), 283–295.
- Hill, A., Harris, C. & Warburton, A. (2000). Effects of sample processing on pesticide residues in fruits and vegetables. Principles and practices of method validation. MPG Books Ltd. Bodmin, Cornwall, UK.
- Jiménez, A., Sierra, C., Rodríguez, F., González, M., Heredia, F., Osorio, C. (2010). Physicochemical characterisation of gulupa (*Passiflora edulis Sims. fo edulis*) fruit from Colombia during the ripening. *Food Research International*, 44, 1912–1918.
- Kim, M., TaeWoo, K., Pyo, H., Yoon, J., Choi, K. & Hong J. (2008). Determination of organochlorine pesticides in sediment using graphitized carbon black solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1208, 25–33.
- Lehotay, S., Son, J., Kwon, H., Koesukwiwat, U., Wusheng, F., Mastovska, K., Eunha, H. & Leepipatpiboon, N. (2010). Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables, *Journal of Chromatography A*, 1217, 2548–2560.
- MADR. (2009). Anuario estadístico de frutas y hortalizas, 2004-2008 y sus calendarios de siembras y cosechas. *Dirección de política sectorial, Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural*. Bogotá.
- Michael, S., Young, K., Tran, V. & Shia, C. (2011). Multi-Residue Pesticide Analysis in Ginseng Powder: Optimized Cleanup After QuEChERS Extraction for UPLC-MS/MS And GC-MS/MS Analysis. Septiembre 2015, de Waters Corporation, Milford, MA, USA, Sitio web: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005006en.pdf>
- Montaño, M. & Guerrero, J. (2001). Validación de una metodología multiresiduo para la determinación de residuos de plaguicidas en fresa (*Fragaria spp.*) por cromatografía de gases. *Revista Colombiana de Química*, 30(1), 37–46.
- Moreno, M. & Guerrero, J. (2002). Validación de una metodología multiresiduo para la determinación de residuos de plaguicidas en repollo. (*Brassica oeracea var. Capitata*) por cromatografía de gases. *Revista Colombiana de Química*, 31(1), 19–32.
- Norli, H.R., Christiansen, A. & Deribe, E. (2011). Application of QuEChERS method for extraction of selected persistent organic pollutants in fish tissue and analysis by gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 7234–7241. doi:10.1016/j.chroma.2011.08.050.

- Oliveira, A.; Carvalho, D.; Silva, F.; Ferreira, E.; Dutra, E. (2014), Pesticide residues in cashew apple, guava, kaki and peach: GC- ECD, GC-FPD and LC-MS/MS multiresidue method validation, analysis and cumulative acute risk assessment. *Food Chemistry*, Accepted Manuscript.
- Paz, M., Correia, L., Becker, H., Longhinotti, E., Domingues, V. & Delerue-Matos, C.(2015). Validation of QuEChERS method for organochlorine pesticides analysis in tamarind (*Tamarindus indica*) products: Peel, fruit and commercial pulp. *Food Control*, 54, 372–384.
- Picó, Y. & Kozmutza, C. (2007). Evaluation of pesticide residue in grape juices and the effect of natural antioxidants on their degradation rate. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 1805–1814.
- Proexport Colombia.(2011), [En línea]. Consultado en agosto 2015. Disponible en: http://www.proexport.com.co/SIICExternoIntelExportProductoImportaciones.aspxTipo=Bieneses&Menu=IntelExportIntelExportProductosseleccion=Importaciones_Realizadas&Header=IntelExport.
- Ramirez, A., Gallo, A., Hoyos, D. & Peñuela, G. (2013). QuEChERS GC-MS validation and monitoring of pesticide residues in different foods in the tomato classification group. *Food Chemistry*, 158, 153–161.
- Rawn, V., Roscoe, T., Krakalovich, C. & Hanson. (2004). N-methyl carbamate concentrations and dietary intake estimates for apple and grape juices available on retail market, *Canada Food Additives and Contaminants*, 21(6), 555–563
- Romero, A. & Gonzalez, A.(2010),[En línea]. Analisis de residualidad de plaguicidas en cultivos de maracuyá (*Passiflora edulis var. Flavicarpa*). Septiembre 2015. Centro internacional de agricultura tropical (CIAT): Cali, Colombia. Sitio web: <http://ciat-library.ciat.cgiar.org:8080/jspui/handle/123456789/2056>
- SANCO, 12571. (2013). Documento de orientación sobre los procedimientos analíticos de control de calidad y validación para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos. Julio 2015, Union Europea. Sitio web: http://ec.europa.eu/food/plant/plantprotectionproducts/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf
- Tadeo, J. L., Sánchez-Brunete, C., Albero, B. & González, L. (2004). Analysis of pesticide residues in fruit juice and beverage. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 34, 165–175.
- Tuzimski, T., Rejczak, T. (2014). Determination of pesticides in sunflower seeds by high-performance liquid chromatography couple with a diode array detector, *J AOAC int.*, 97(4), 1012–1020.