

**Aseguramiento de la calidad analítica para la determinación de plaguicidas en
gulupa (*Passiflora edulis Sims*) mediante cromatografía líquida acoplada a
espectrometría de masas**

**Trabajo para optar por el título de
Magíster en Gestión de la Calidad de Alimentos.**

Ana María Muñoz Jiménez

Asesor

Luis Fernando Garcés

PhD

Corporación Universitaria Lasallista

Maestría en Gestión de Calidad de Alimentos

Caldas – Antioquia

2018

Tabla de contenido

| | |
|--|----|
| Introducción..... | 9 |
| Justificación..... | 12 |
| Objetivos | 15 |
| Objetivo General:..... | 15 |
| Objetivos Específicos | 15 |
| Marco teórico..... | 16 |
| Seguridad y calidad alimentaria..... | 16 |
| Plaguicidas..... | 18 |
| Panorama nacional en el marco regulatorio. | 23 |
| Gulupa..... | 25 |
| Preparación de la muestra..... | 30 |
| Técnica de análisis..... | 34 |
| Validación de métodos analíticos | 38 |
| Materiales y métodos | 41 |
| Instrumentos..... | 41 |
| Reactivos, solventes y demás materiales utilizados | 42 |
| Preparación de soluciones | 43 |
| Estándar interno y sustituto (surrogate)..... | 45 |
| Muestras de gulupa | 45 |
| Condiciones optimizadas en el sistema UPLC-MS/MS..... | 46 |
| Optimización de las transiciones | 47 |
| Optimización de fases móviles y gradientes..... | 47 |
| Optimización del método QuEChERS para la determinación de pesticidas en gulupa | 48 |
| Validación del método para el análisis de pesticidas en gulupa..... | 50 |
| Selectividad | 50 |
| Curva de calibración y rango lineal | 50 |
| Efecto Matriz..... | 51 |
| Límite de detección y límite de cuantificación | 51 |
| Porcentaje de recuperación para la evaluación de la exactitud..... | 52 |

| | |
|--|----|
| Precisión (repetibilidad y Precisión intermedia)..... | 52 |
| Robustez..... | 53 |
| Aplicación del método. | 53 |
| Resultados y discusión | 54 |
| Optimización de condiciones cromatográficas..... | 54 |
| Optimización de condiciones espectrométricas..... | 58 |
| Optimización de la preparación de muestras..... | 60 |
| Validación del método de QUEChERS citrato optimizado | 63 |
| Selectividad | 64 |
| Linealidad, Rango de trabajo y Efecto Matriz | 64 |
| Exactitud y precisión | 67 |
| Límite de detección y límite de cuantificación | 69 |
| Robustez..... | 69 |
| Aplicación del método | 71 |
| Conclusiones y recomendaciones..... | 72 |
| Sugerencias para trabajos futuros. | 74 |
| Referencias..... | 75 |

Listas de figuras

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. GULUPA RECIBIDA EN EL LABORATORIO DE TRAZABILIDAD Y RESIDUALIDAD..... | 27 |
| FIGURA 2. VOLUMEN DE EXPORTACIONES DE GULUPA DEL 2011 AL 2015..... | 29 |
| FIGURA 3. ESQUEMA DE LA FUENTE DE IONIZACIÓN ESI..... | 37 |
| FIGURA 4. ESQUEMA DE UN TRIPLE CUADRUPOLO | 38 |
| FIGURA 5. INFRAESTRUCTURA NACIONAL DE CALIDAD. | 39 |
| FIGURA 6. EXTRACTO DE GULUPA (0,100 MG/KG) INYECTADO SIN MODIFICADORES (A), 5MM FORMIATO DE AMONIO (B) Y CON 10 M M DE FORMIATO DE AMONIO (C)..... | 56 |
| FIGURA 7. CROMATOGRAMA A UNA CONCENTRACIÓN DE 100 MG/L EN UNA MUESTRA BLANCO DOPADA OBTENIDA POR UPLC-MS/MS..... | 58 |
| FIGURA 8. NÚMERO DE PESTICIDAS OBTENIDOS CON CADA MÉTODO QUECHERS SIN LIMPIEZA. | 60 |
| FIGURA 9. REPRESENTACIÓN DE LA ETAPA DE LIMPIEZA: 1) EXTRACTO DE CASCARA; 2) EXTRACTO DE PULPA, A-CON PSA B- C18, C-GCB Y D- SIN SORBENTE. | 62 |
| FIGURA 10. REPRESENTACIÓN DEL MÉTODO QUECHERS CITRATO PROPUESTO PARA LA EXTRACCIÓN DE PESTICIDAS EN GULUPA. | 63 |
| FIGURA 11. EFECTO MATRIZ PARA LOS ANALITOS EVALUADOS..... | 66 |

Lista de tablas

| | |
|---|----|
| TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LOS PLAGUICIDAS SEGÚN SU TOXICIDAD EN MG/KG | 19 |
| TABLA 2. LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS (LMR) ESTABLECIDOS PARA LA GULUPA POR LA UNIÓN EUROPEA..... | 21 |
| TABLA 3. LMR DESCRITOS EN LA RESOLUCIÓN 2906 Y PRODUCTOS AGRÍCOLAS INSCRITOS PARA ESTE CULTIVO ANTE EL ICA. | 23 |
| TABLA 4. COMPOSICIÓN DE NUTRIENTES Y MINERALES POR CADA 100 G DE GULUPA..... | 27 |
| TABLA 5. COMPARACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PESTICIDAS | 33 |
| TABLA 6. PARÁMETROS EVALUADOS DURANTE LA ETAPA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS. | 40 |
| TABLA 7. INFORMACIÓN RELEVANTE DE LOS COMPUESTOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO. ... | 44 |
| TABLA 8. EVALUACIÓN DE LA FASE MÓVIL PARA EL DESARROLLO DEL MÉTODO..... | 48 |
| TABLA 9. RESULTADOS DE LA DETECCIÓN PARA LOS PESTICIDAS EVALUADOS. TODAS LAS ÁREAS DE LOS PICOS SE NORMALIZARON CONTRA EL ÁREA DE PICO MÁXIMA LOGRADA PARA ESE COMPUESTO. EN CONSECUENCIA, EL 100% INDICA EL ÁREA DE PICO MÁS ALTA LOGRADA Y SE RESALTA..... | 54 |
| TABLA 10. CONDICIONES OPTIMIZADAS PARA EL MÉTODO EN DESARROLLO. | 57 |
| TABLA 11. PESTICIDAS ANALIZADOS CON SUS RESPECTIVOS TIEMPOS DE RETENCIÓN (tR), IONES PRECURSORES, IONES PRODUCTOS Y ENERGÍA DE COLISIÓN (EC) DE LAS TRANSICIONES MONITOREADAS..... | 59 |
| TABLA 12. COEFICIENTES DE DETERMINACIÓN PARA CURVAS PREPARADAS EN SOLVENTE Y EXTRACTO BLANCO DE MATRIZ Y EFECTO MATRIZ OBTENIDOS PARA LOS COMPUESTOS EN ESTUDIO. | 65 |
| TABLA 13. RESULTADOS DE RECUPERACIÓN (R) Y CV PARA LOS ENSAYOS DE REPETIBILIDAD Y PRECISIÓN INTERMEDIA REALIZADOS EN CASCARA Y PULPA EN LOS DIFERENTES NIVELES DE DOPAJE. | 68 |
| TABLA 14. RESULTADOS DE ROBUSTEZ DEL MÉTODO. | 70 |

Abreviaturas

AF-ácido fórmico;

C18 - sílice modificada con hidrocarburo lineal C18, octadecilsilano;

CI - ionización química, del inglés *chemical ionization*;

CV- coeficiente de variación;

d-SPE - extracción en fase sólida dispersiva, del inglés *dispersive solid phase extraction*

ESI - ionización por electronebulización, del inglés *electrospray ionization*;

EU - Unión Europea;

Fam- formiato de amonio;

FAO - Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura, del inglés *Food and Agriculture Organization of the United Nations*;

GC-MS - cromatografía gaseosa acoplada a la espectrometría de masas, del inglés *gas chromatography mass spectrometry*;

HPLC-MS/MS - cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a la espectrometría de masas en serie, del inglés *high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*;

ISO - Organización Internacional para la Estandarización, del inglés *International Organization for Standardization*;

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry;

LC-MS/MS - Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en serie, del inglés *liquid chromatography mass spectrometry*;

LLE - extracción líquido-líquido; del inglés *liquid liquid extraction*

LMR - límite máximo de residuos;

LOD - límite de detección, del inglés *limit of detection*;

LOQ - límite de cuantificación, del inglés *limit of quantification*;

MAE - extracción asistida por microondas, del inglés *microway-assistance extraction*,

MeCN- acetonitrilo;

MeOH- metanol;

MSPD - dispersión de la matriz en fase sólida, del inglés *matrix solid phase dispersion*;

m/z – relación masa sobre carga;

EI - Estándar Interno;

pKa - constante de disociación ácida;

pKb - constante de disociación básica;

PLE - extracción líquida presurizada, del inglés *pressurised-liquid extract*;

PSA - Amina primaria y secundaria, del inglés *primary secondary amine*;

QuEChERS - Rápido, fácil, económico, robusto y seguro, del inglés *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*;

r^2 - coeficiente de determinación;

SBSE - extracción sortiva en barra de agitación, del inglés *stir-bar sorptive extraction*;

SPE - extracción en fase sólida, del inglés *solid phase extraction*;

SPME - microextracción en fase sólida, del inglés *solid phase micro extraction*;

MRM - monitoreo de reacciones múltiples, del inglés *multiple reaction monitoring*;

tR - tiempo de retención;

UPLC-MS / MS: cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas en serie, del inglés *ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*

Resumen

Con el crecimiento del cultivo de la Gulupa en Antioquia y su importancia económica para el sector productivo de las exportaciones, bajo las exigencias del mercado internacional encadenadas con la calidad e inocuidad de las frutas, se ha generado la necesidad de abordar y profundizar en temas de investigación relacionados con la sanidad vegetal que permitan garantizar la concentración de compuestos contaminantes. Por consiguiente, en este trabajo se estandarizó y validó un método multiresiduo rápido y eficaz para la determinación de 22 pesticidas en *passiflora edulis sims*. Fue utilizado el método QuEChERS para la preparación de muestra seguida por el análisis de los compuestos por cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a la espectrometría de masas en serie (UPLC-MS/MS), con modo de ionización por electrospray empleando analizador de triple cuadrupolo. Los resultados de validación fueron satisfactorios, ya que el método presentó recuperaciones entre 84 y 106%, con coeficientes de variación (CV) <20% para muestras blanco de 10 a 100 µg/kg. Los límites de detección y de cuantificación fueron de 3,0 y 10 µg/kg, respectivamente. El efecto de matriz varió de -49 a 32% y se ha corregido utilizando la curva analítica en extracto de gulupa. La linealidad se estableció de 5,0 a 500 µg/kg, con $r^2 \geq 0.95$ y residuales menores al 20%. El procedimiento propuesto combina las ventajas de una etapa de preparación de muestra simple y rápida, y cuenta además con la elevada selectividad y sensibilidad del sistema UPLC-MS/MS empleando monitoreo de reacciones seleccionadas. Finalmente, el método descrito fue aplicado con éxito en muestras reales, encontrando cinco residuos de plaguicidas en los productos evaluados demostrando con ello ser una alternativa

eficiente para el análisis de rutina.

Palabras clave: plaguicidas, *passiflora edulis Sims*, cromatografía líquida, espectrometría de masas, validación de métodos, multiresiduo.

.

Introducción

Los plaguicidas al prevenir las pérdidas de cosechas por insectos y otras plagas pueden generar aumento en la productividad, aunque su uso indiscriminado trae consigo problemas ambientales y de salud tanto para quien lo aplica como para quien lo consume.

La exposición a los plaguicidas, incluyendo sus metabolitos puede tener efectos agudos, crónicos y a largo plazo, algunos presentan bioacumulación y persistencia medioambiental; algunas de las mayores preocupaciones son la capacidad carcinogénica que presentan, así como el ocasionar alteraciones reproductivas (Perez, Navarro, & Miranda, 2013, 46), además contaminan los recursos naturales y perturban el equilibrio del ecosistema. Es importante, la determinación de estos contaminantes en alimentos, especialmente en frutas y hortalizas con el fin de garantizar su inocuidad y por ende que lleguen a ser nutritivas para la población; por lo anterior se imponen normas cada vez más rigurosas exigiendo a los laboratorios de análisis que se dedican a estas determinaciones a ofrecer condiciones como: ampliar la lista de analitos; detectar analitos en niveles inferiores que los legislados; que se cuenten con la precisión y la calidad necesaria; además, de que los tiempos para el análisis sean cortos y se reduzcan costos entre otros.

Una de estas frutas es la gulupa, pasiflora que hace parte de las frutas de la pasión¹ la cual posee un enorme potencial tanto para consumo interno como para la exportación, actualmente se cultiva en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá y Antioquia; ocupa el tercer lugar de exportación entre las frutas del mercado

¹ La apariencia de la flor, similar a una corona de espinas, recuerda a la pasión de Jesucristo, de allí su nombre.
<https://exoticfruitbox.com/es/frutas-exoticas/fruta-de-la-pasion/>

colombiano, es utilizada como tranquilizante, posee alto contenido de vitamina C y mejora la función digestiva (Ocampo Perez & Wyckhuys, 2012, 11). En el proceso de producción, se utilizan en gran medida insecticidas y fungicidas que pueden ser no aptos para la exportación, lo cual, si se prueba que estas poseen alguna concentración de contaminantes, las frutas se devuelven y no se permite su comercialización en el ámbito internacional cuyos mercados son actualmente Inglaterra, los Países bajos y Japón.

Algunas de las técnicas que se utilizan para determinar la concentración de plaguicidas en frutas y que permiten alcanzar los niveles que exige la legislación (alrededor de unos pocos $\mu\text{g/L}$) son en la actualidad: la cromatografía de gases (GC), la cromatografía líquida (LC) y la electroforesis capilar; la elección de una técnica u otra dependerá de factores tales como: propiedades de los analitos, efectividad, rapidez, selectividad, sensibilidad, costos, disponibilidad, compatibilidad con el medio ambiente y capacidad de análisis, entre otras (Chang, Hsieh, & Chiu, 2016, 3-10; Dasika, Tangirala, & Naishadham, 2012, 20; Hussain & Siddique, 2010, 21-22). De esta manera y aprovechando que el Laboratorio de Residualidad y Trazabilidad de la Corporación Universitaria Lasallista cuenta con la infraestructura y la tecnología necesaria para el desarrollo científico y tecnológico, como son los equipos de cromatografía líquida acoplados a espectrometría de masas, lo que le confiere lograr la sensibilidad y especificidad requerida en dichos análisis, y debido a que actualmente el país cuenta con pocos laboratorios que se dediquen a la determinación de plaguicidas, y más aún que se encuentren acreditados bajo la NTC-ISO/IEC-17025 (ISO & IEC, 2005), se pretende que la determinación de estos en frutas sea con base en dicha norma y apoyados también en la guía SANTE (European Commission- SANTE, 2015)

con el fin de determinar si la gulupa posee los niveles adecuados de plaguicidas (Límite Máximo de Residuo-LMR), y así poder ser consumidos por la población nacional o la posibilidad de ser exportada a mercados extranjeros de forma inocua.

Justificación

Debido al incremento en la exportación de la gulupa especialmente al mercado europeo, al pasar de 5447,02 Toneladas en 2015 a 6367,22 en 2016, teniendo un crecimiento del 16,9% (Asociación Nacional de Comercio Exterior, 2016, 2), aumento dado por el uso de productos de síntesis química para el control de enfermedades y plagas (FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2011). El movimiento y persistencia de estos plaguicidas en plantas, frutos y suelos podría conducir a niveles altos de sustancias tóxicas que actúan como un riesgo para la salud humana y los ecosistemas (Antón, Juraske, Castells, Vijay, & Muñoz, 2009, 684), por lo anterior se hace necesaria la determinación de plaguicidas en esta fruta, especialmente por las condiciones de aceptación y de calidad que se tienen en dicho continente para el producto en cuestión. El uso indiscriminado de plaguicidas puede llevar a una devolución del producto, por tanto pérdidas en producción o generar en el mercado interno una alerta por superar los límites máximos residuales, debido a los desórdenes que pueden causar en la salud del consumidor así como el impacto ambiental que generan las concentraciones altas de estos compuestos.

La fabricación de plaguicidas en Colombia cuenta con un volumen alrededor de unas 34.800 toneladas para obtener productos sólidos y de 55.800 litros para las presentaciones líquidas por año (Buitrago & Gómez, 2007, 4). En los últimos 30 años, se han duplicado los registros de plaguicidas ante el Instituto colombiano Agropecuario, pasando de 770 productos en 1974 (formulados con base en 186

ingredientes activos), a 1.3705 en el 2003 formulados con base en 400 ingredientes activos, correspondientes a grupos químicos como carbamatos y organofosforados (Cárdenas, Silva, & Ortiz, 2010, 96). De acuerdo con el ICA, durante el 2010 Colombia produjo 15'999.216 litros de herbicidas, 6'392.387 litros de insecticidas y 19'690.293 kilogramos de fungidas (ICA, 2011, 9). En este sentido, la producción, manufactura y aplicación de este tipo de sustancias en el país es elevada y por ende las condiciones de salud humana y el estado ambiental se pueden ver afectadas.

El estudio de problemas de salud humana debido al uso indiscriminado de plaguicidas en alimentos ha sido ampliamente estudiado, incluyendo los riesgos que pueden producir estos al consumir frutas u hortalizas (Arias, Bojacá, Ahumada, & Schrevens, 2014, 224; Cárdenas et al., 2010, 102; Gold, Slone, Ames, & Manley, 2001, 803) así como intoxicaciones humanas por absorción en piel (Lesmes-Fabian, García-Santos, Leuenberger, Nuyttens, & Binder, 2012, 205-206) o por inhalación (Lee, McLaughlin, Harnly, Gunier, & Kreutzer, 2014, 1178-1180). De esta forma, se requiere incrementar el conocimiento de este tipo de problemáticas en el país ya que la información sobre la presencia, determinación y análisis de residuos de plaguicidas específicamente en suelos y follaje de cultivos de gulupa es escasa a nivel mundial y nacional.

Con este trabajo se desarrolló un método analítico para la determinación de plaguicidas en gulupa con base en la Norma Técnica Colombiana **NTC-ISO/IEC 17025:2005** y la guía SANTE (European Commission- SANTE, 2015), esto con el fin de garantizar que dichas determinaciones posean la calidad analítica necesaria y la capacidad de responder a las necesidades de los productores cuando se enfrentan a

procesos de exportación, especialmente el mercado europeo.

Es así como se espera darle fortalecimiento a los productores de gulupa para la exportación de dicha fruta, pues la emisión de un certificado de análisis que declare la concentración de plaguicidas en una muestra, resultado de un control analítico estricto genera confianza y bienestar en los agricultores al ratificar el buen uso de BPA (buenas prácticas agrícolas); esto se llevará a cabo procesando muestras provenientes del oriente y suroeste antioqueño, de predios que se encuentran en procesos de certificación como exportadores, de esta manera ellos contarán con el respaldo que da tener un certificado de análisis de sus frutas con la calidad analítica adecuada.

Por lo anterior se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cómo se puede implementar un método de análisis validado que garantice la eficacia y la confiabilidad en los análisis para la detección de plaguicidas en frutas y en especial en la gulupa?

Objetivos

Objetivo General:

Desarrollar un método analítico para la determinación de plaguicidas en gulupa (*Passiflora edulis Sims*) con base en la Norma Técnica Colombiana **NTC-ISO/IEC 17025:2005** y la guía SANTE.

Objetivos Específicos

- Estandarizar las condiciones de extracción de los plaguicidas presentes en la gulupa mediante QuEChERS para la recuperación adecuada.
- Validar el método de separación de los plaguicidas del extracto de gulupa por medio de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) con un alcance de confiabilidad exigida por la normativa internacional.
- Implementar un protocolo analítico para la cuantificación de los diferentes plaguicidas en gulupa, con base en la **NTC-ISO/IEC 17025:2005** y la guía SANTE.

Marco teórico

Seguridad y calidad alimentaria.

El concepto seguridad alimentaria, ha tenido una evolución que se debe considerar. Se podría decir que su primera acepción se remonta a 1943, año en el cual los Estados Unidos tuvieron, entre sus propósitos, la liberación de la miseria en relación con la alimentación y la agricultura llegando a la conclusión de que esta meta implicaba un suministro seguro, suficiente y adecuado de alimentos para cada hombre, mujer y niño. En esta concepción, el término “seguro” se refería a la accesibilidad de los alimentos; “suficiente” hacía referencia a la suficiencia cuantitativa del suministro de alimentos y “adecuado” estaba asociado al contenido de nutrientes del suministro de alimentos (Comité de Seguridad Alimentaria Mundial. CSA, 2012, 4).

Esta concepción sobre seguridad alimentaria no solo fue aplicada en América sino también en Europa durante la posguerra, cuando se exigía contar con alimentos que permitieran a la población mantener un nivel mínimo de energía y que además, tuvieran los nutrientes necesarios para otorgar una buena salud.

En 1974 nace el Comité de Seguridad Alimentaria Mundial como órgano gubernamental destinado a servir de foro para revisar las políticas de inocuidad y realizar el seguimiento de estas. Su objetivo es constituirse en la principal plataforma internacional e intergubernamental inclusiva para que todas las partes interesadas trabajen de forma coordinada con miras a garantizar la seguridad alimentaria y la nutrición para todos (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura, 2016), en este espacio se han venido llevando a cabo diferentes plenarios

con el fin de cumplir a cabalidad su objetivo.

En 1996 el CSA adoptó la siguiente definición:

Existe seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias en cuanto a los alimentos a fin de llevar una vida activa y sana (FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2006, 1)

Esta definición se articula a la disponibilidad, acceso, estabilidad y utilización de los alimentos e incorpora los aspectos de una buena nutrición relacionados con la alimentación y los cuidados.

Considerando todo lo anterior, la determinación de contaminantes en muestras ambientales, especialmente en alimentos, se hace necesaria pues la presencia de esas sustancias amenaza la calidad de los alimentos y, claro está, pone en riesgo la seguridad alimentaria.

En cuanto a la conceptualización de las sustancias objeto de este escrito, vale señalar que la palabra plaguicida es definida por el *Codex Alimentarius* como:

Cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos.(FAO - Organización

de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1999, 25).

Sin embargo, cuando estas sustancias superan concentraciones permitidas se convierten en contaminantes que pueden causar efectos adversos para la salud o el medio ambiente. A modo de ejemplo se presenta el tebuconazol, el cual es un residuo monitoreado en varias muestras alimentarias, tiene un valor de Límite Máximo de Residuo (en adelante LMR) de 0,05 mg/kg en cítricos (Infoagro, 2017), de esta manera si su concentración en dicha fruta supera este valor se considera riesgoso.

Plaguicidas

Los plaguicidas son productos de origen natural o sintético utilizados para controlar plagas. Estos productos normalmente contienen un principio activo (impide, destruye, repele o mitiga una plaga) e ingredientes inertes que son todos los demás componentes importantes para el rendimiento del producto y la facilidad de su uso. Estos compuestos pueden clasificarse según la toxicidad (Tabla 1), la vida media, el ámbito de aplicación o su estructura química. Conforme a su toxicidad, pueden ser extremadamente peligrosos, altamente peligrosos, moderadamente peligrosos (clase II), ligeramente peligrosos y productos que no ofrecen peligro. Según su vida media, pueden ser permanentes (vida media indefinida), persistentes (de varios meses a 20 años), moderadamente persistentes (de 1 a 18 meses) y no persistentes (vida media de días, hasta de 12 semanas). Dada su estructura química se clasifican en diversas familias como los organoclorados, los organofosforados, los carbamatos y los piretroides y demás (World Health Organisation, 2004, 8 y 9; Ramírez y Lacasaña, 2001, 3).

Respecto al ámbito de aplicación al que están destinados, pueden clasificarse como acaricidas, antibióticos, avicidas, bactericidas, defoliantes, desinfectantes, fumigantes, fungicidas, herbicidas, insecticidas, larvicidas, molusquicidas, nematocidas, ovicidas, repelentes y raticidas, entre otros.

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad en mg/kg

| Clasificación Toxicológica de los plaguicidas | | |
|--|--|--|
| Clasificación de la OMS según los riesgos | Formulación líquida ² DL ₅₀ aguda oral | Formulación sólida DL ₅₀ aguda oral |
| Extremadamente peligroso (clase Ia) | > 20 | > 5 |
| Altamente peligrosos (clase Ib) | 20-200 | 5- 50 |
| Moderadamente peligrosos (clase II) | 200-2000 | 50-500 |
| Ligeramente peligrosos (clase III) | 2000-3000 | 500-2000 |
| No ofrece peligro (clase IV) | > a 3000 | > a 2000 |

Fuente: World Health Organisation, 2004.

Con lo anterior, si el valor de la dosis letal mediana (DL₅₀) oral es 5 mg/kg la cantidad necesaria para matar una persona de 70 kg serían unas cuantas gotas, si el valor es 50 mg/kg, media cucharada a dos cucharadas soperas y si este valor es mayor a 500 mg/kg más de dos cucharadas soperas bastarían.

La salud humana puede verse afectada por la exposición directa o colateral a los plaguicidas. Respecto a la exposición directa, la actividad agrícola es la fuente principal, tanto para los operarios que aplican los plaguicidas como para los trabajadores de la industria química fabricante de los mismos y, en general, para todos aquellos que formulan, producen, combinan, trasladan, almacenan o aplican plaguicidas (Benítez, 2012, 32). Por otro lado, debe considerarse la intoxicación

² Los términos sólido y líquido se refieren al estado físico del plaguicida que está siendo clasificado.

crónica derivada de la exposición prolongada a dosis muy bajas, ya sea de uno o varios de estos contaminantes, provocada generalmente por su presencia en diferentes tipos de matrices como agua (Chen, Haung, & Huang, 2014, 117; Santos, Aparicio, Alonso, & Callejón, 2005, 117-118), suelo (Pintado-Herrera, González-Mazo & Lara-Martín, 2016, 108-109), aire (Barro, Ares, García-Jares, Llompart & Cela, 2004, 190) y alimentos (Ramírez & Lacasaña, 2001, 7).

El uso de plaguicidas se ve justificado en la producción agrícola debido a que proporcionan alimentos de calidad y de manera eficiente a la creciente población mundial, pero a la vez genera grandes problemas que necesitan una solución, es decir, es necesario atender los impactos (intoxicaciones, costos sociales, ambientales y económicos) que se generan por su constante aplicación (García, 1998, 383). Es importante conocer los riesgos y la toxicidad de estos compuestos, así como asegurar una correcta aplicación (buenas prácticas agrícolas, pautas de seguridad establecidas, aplicación de dosis adecuadas, tiempos de seguridad indicados y demás), de manera que el alimento llegue al consumidor con mínimos riesgos para su salud (Torrado Pacheco, 2005, 9). Sin embargo, no siempre se siguen de manera eficaz estas indicaciones y, al no existir una inspección adecuada, los alimentos pueden llegar al consumidor con niveles de plaguicidas más altos de los permitidos. Como consecuencia, se hace necesario su análisis, especialmente en alimentos (frutas y hortalizas), con el fin de asegurar inocuidad en su consumo, pues su liposolubilidad facilita el proceso de bioacumulación en el organismo, potenciando a futuro el deterioro de la salud humana (Pérez, Navarro & Miranda, 2013, 46). La mayoría de los plaguicidas utilizados actualmente presentan diversos efectos adversos, entre ellos la

inhibición de la colinesterasa, la afectación del sistema endocrino, los efectos mutagénicos y carcinogénicos, alteraciones del sistema inmunológico y de la piel entre otros (Balali-Mood & Balali-Mood, 2008, 69-70; Bini Dhouib et al., 2016, 86-88; Hernández et al., 2013, 143; Jiménez Venegas, Quilodrán Peredo, Miranda Olivares, & Rodríguez Bustos, 2008, 19-20; Pestana et al., 2012, 169; Soloneski, Kujawski, Scuto, & Larramendy, 2015, 835 y 840).

Por lo anterior, algunos países u organizaciones regulan su uso, así como las concentraciones en las cuales deben estar presentes en los alimentos.

En el caso de la gulupa no se posee una regulación específica, sin embargo, la Unión Europea determinó, a través del Reglamento N° 600/2010, que esta fruta debe ser clasificada en el grupo de las frutas pequeñas de piel no comestible. La Tabla 2 presenta los límites máximos de residuos establecidos para la gulupa por la Unión Europea (Infoagro, 2017, 1-4).

Tabla 2. Límites máximos de residuos (LMR) establecidos para la gulupa por la Unión Europea.

| Analíto | LMR (mg/kg) |
|----------------|------------------------|
| 2,4 D | 0,05 |
| Abamectina | 0,01 |
| Azoxistrobin | 0,05 |
| Boscalid | - |
| Cimoxanil | 0,05 |
| Ciromacine | 0,05 |
| Difenoconazol | 0,02 |
| Etofenprox | 0,01 |
| Etoprofós | 0,02 |
| Fenhexamide | 0,05 |
| Fipronil | 0,01 |
| Linuron | 0,05 |
| Malation | 0,5 |

| | |
|-----------------|------|
| metamidofos | 0,01 |
| metomil | 0,05 |
| Miclobutanil | 0,02 |
| Ofurace | 0,5 |
| Picloram | 0,1 |
| Profenofós | 0,05 |
| spinetoram | - |
| Spinosad A | 0,02 |
| Spinosad D | 0,02 |
| Spiromesifen | - |
| Tebuconazol | 0,05 |
| Triadimefon | 0,1 |
| Triadimenol | 0,1 |
| Trifloxistrobin | 0,02 |

Fuente: (Infoagro, 2017)

En Colombia no se tiene regulación específica para esta fruta, la resolución 2906 presenta los LMR para frutas tropicales y para frutas pequeñas (Ministerio del Medio Ambiente y de La Protección Social, 2007, 5 y 18), de igual manera se presentan algunos productos comerciales para este cultivo inscritos ante el ICA (Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), 2017,3,29,69,96,143), toda esta información se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3. LMR descritos en la resolución 2906 y productos agrícolas inscritos para este cultivo ante el ICA.

| LMR en mg/kg para las frutas pequeñas y tropicales según la resolución 2906 | | Producto agrícola inscrito ante el ICA para el cultivo de gulupa | |
|---|--------|--|------------------------------|
| Analíto | LMR | Producto comercial | Principio activo |
| Glufosinato-amonio | 0,05 | Atlas 25 EW | Tebuconazole |
| Paraquat | 0,01 | Proteus® OD | Thiacloprid/deltametrina |
| Plocloraz | 7,0 Po | Exalt 60 SC | Spinetoram |
| 2,4 D | 0,1 | Absolute®60 EC | |
| Carbendazim | 1,0 | Sivacur combi 300 EC | Tebuconazole/ Triadimenol |
| Cipermetrin | 0,5 | Casta 310 SC | Lambdacyhalotrina/fipronil |
| Fenvalerato | 1,0 | | |

Panorama nacional en el marco regulatorio.

Actualmente crece la preocupación por los efectos en la salud que trae la amplia utilización de los plaguicidas en las actividades agrícolas principalmente y, más concretamente, por la concentración de estos compuestos tóxicos presentes en agua y alimentos (Muresan et al., 2015, 1), incluyendo no solo su forma molecular original, sino también a cualquiera de sus metabolitos, productos de reacciones e impurezas de importancia toxicológica. Pero su presencia no solo afecta la salud pública sino también el comercio, además de constituir un riesgo para los consumidores y también una barrera que limita la comercialización de productos en los mercados

internacionales (Maki Díaz, 2014, 21-24). Así entonces, el asunto de los plaguicidas se ha convertido en uno de los problemas ambientales que despiertan más interés investigativo en el mundo.

El LMR, o tolerancia, es la cantidad máxima permitida por la ley de residuo de un determinado plaguicida sobre un producto, por ello se trata de un concepto legal y las cifras que expresan estos límites no son necesariamente un indicativo de la toxicidad del plaguicida (Torrado Pacheco, 2005b, 2). El *Codex Alimentarius* define el LMR como “la concentración máxima de residuos de un plaguicida (expresada en mg/kg) para que se permita legalmente su uso en la superficie o en la parte interna de los productos alimenticios para consumo humano y de piensos” (FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1999). Estos valores permiten controlar el uso de plaguicidas, facilitan el comercio y protegen al consumidor pues de esta manera se mantiene una agricultura sostenible que contribuya a lograr estándares elevados con respecto a la salud pública y a la seguridad medioambiental.

La legislación colombiana aún no se ha implementado de manera eficaz en el ámbito de monitorear, vigilar, diagnosticar o determinar plaguicidas en alimentos y existe una tendencia fuerte de los agricultores a usar plaguicidas en forma excesiva, debido especialmente a motivaciones económicas (Murcia & Stashenko, 2008, 74).

Algunos países latinoamericanos, incluido Colombia, han acogido como estándares nacionales los LMR del *Codex*, sin embargo algunos países europeos han establecido sus propios valores, de esta manera se vela, tanto en productos nacionales como de importación, para que los requisitos regulatorios se cumplan, de lo

contrario la contravención acarrea sanciones que van desde la destrucción del lote hasta la suspensión de la comercialización del alimento implicado (Torrado Pacheco, 2005a, 3).

Actualmente, respecto a reglamentación nacional sobre el uso y manejo de plaguicidas, se encuentran el Decreto 1843 de 1991 por el cual se reglamenta el uso de plaguicidas así como la creación del Consejo Seccional de Plaguicidas (Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Rural, 1991), también se tiene la Resolución 3759 del 2003, por la cual se dictan disposiciones sobre el registro y control de los plaguicidas químicos de uso agrícola (Instituto Colombiano Agropecuario. ICA, 2003), la Resolución 1023 de 1997 la cual dicta las disposiciones sobre la distribución, comercialización y venta de insumos agropecuarios (ICA, 1997), y muy especialmente la Resolución 2906 la cual establece los Límites Máximos de Residuos de Plaguicidas (LRM) en alimentos para consumo humano y en piensos o forrajes (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y Ministerio de Salud y de la Protección Social, 2007).

Con el fin de tener un control adecuado de los residuos de plaguicidas se fija un valor en los diferentes alimentos, en el caso de Colombia estos los establece la Resolución 2906 de 2007 (Ministerio del Medio Ambiente y de La Protección Social, 2007), sin embargo cuando no se menciona un residuo en algún alimento el valor que se establece por defecto es 0,01 mg/kg (Unión Europea, 2005).

Gulupa

La gulupa es una fruta tropical perteneciente a la familia *Passifloraceae*, tiene un alto consumo en los países de la Unión Europea, por lo que la producción de esta fruta

en países tropicales es creciente y ha ayudado al desarrollo del comercio agropecuario entre Colombia y la UE, que pasó de US\$3266 millones a US\$3766 millones con un crecimiento del 16% entre agosto de 2013 y marzo del 2015 según reporta Acción Global (Acción Global S.A, 2015, 30).

La fruta se cultiva principalmente en los departamentos de Huila, Cundinamarca, Valle del Cauca, Antioquia y el Eje Cafetero. En Colombia, el cultivo de gulupa tiene un área promedio anual de 700 hectáreas y pretende incrementar 20% esta cifra con el objetivo de establecer 120 más. Holanda, Alemania, Bélgica, Reino Unido y Canadá son los principales destinos de las exportaciones colombianas (Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Rural, 2015). Actualmente los países con admisibilidad para exportar esta pasiflora son: Alemania, Arabia Saudita, Bélgica, Brasil, Canadá, Emiratos Árabes, España, Francia, Holanda, Inglaterra, Irlanda, Italia, Líbano, Noruega, Portugal, Reino Unido, Rusia y Suiza. Y los países en proceso de admisibilidad son: Ecuador, Chile y México (ICA, 2017)

La variedad climática de Colombia le permite cultivar frutas durante todo el año, y esta condición le otorga al país gran competitividad para desarrollar los cultivos de este producto. Adicionalmente, las frutas colombianas han sido reconocidas por su calidad que está, a su vez, asociada a sus características organolépticas como sabor, aroma, contenido de sólidos solubles o grados Brix, capacidad antioxidante. Estas virtudes las ha posicionado privilegiadamente en los mercados extranjeros.

El fruto de gulupa posee una forma esférica. Su parte externa (pericarpio) es lisa y firme; varía entre los colores verde claro a púrpura oscuro dependiendo del grado de

maduración, mientras que en su interior es blanca, suave y se compone de semillas negras y ovaladas, con pulpa de color amarillo a naranja (arilo), la cual es empleada para el consumo directo o en la preparación de diferentes recetas tales como: jugos, néctares y postres (Orjuela Baquero, Moreno Chacón, Hernández & Melgarejo, 2011, 8). En la figura 1 se observa la apariencia de la fruta.

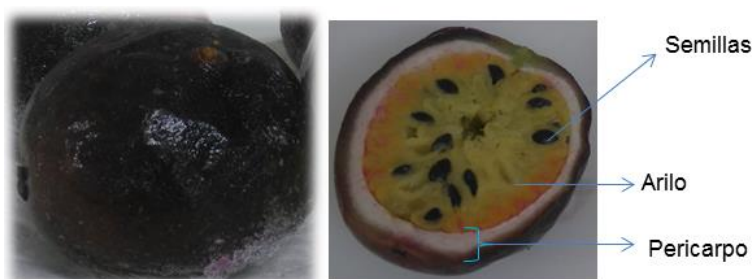


Figura 1. Gulupa recibida en el Laboratorio de Trazabilidad y Residualidad

Fuente: propia.

Los beneficios asociados a esta fruta exótica están relacionados principalmente con su composición nutricional (Tabla 4). Entre sus principales componentes se puede resaltar: elevadas cantidades de ácidos grasos poliinsaturados; vitaminas A, B, C y compuestos bioactivos carotenoides y antocianinas, entre otros (Orjuela Baquero, Moreno Chacón, Hernández & Melgarejo, 2011, 9).

Tabla 4. Composición de nutrientes y minerales por cada 100 g de gulupa.

| Componente | Valor |
|-------------------|--------------|
| Agua | 88,9 g |
| Proteína | 1,5 g |
| Grasa | 0,5 g |
| Carbohidratos | 11,0 g |
| Fibra | 0,4 g |
| Cenizas | 0,7 g |

| | |
|-----------------|----------|
| Calcio | 9,0 mg |
| Fósforo | 21,0 mg |
| Hierro | 1,7 mg |
| Carotenoides | 1,6 mg |
| Tiamina | 0,1 mg |
| Riboflavina | 0,17 mg |
| Niacina | 0,8 mg |
| Ácido ascórbico | 20,0 mg |
| Vitamina A | 1730 U.I |
| Calorias | 49 cal |

Fuente: (Orjuela Baquero et al., 2011)

En Colombia, la gulupa se ha convertido en una de las frutas con mayor aceptación en el exterior. Hacia los Países Bajos, por ejemplo, las exportaciones pasaron de 293 toneladas en 2013 a 731 en 2015 creciendo 249% (Ministerio de Agricultura , 2016); de esta manera la gulupa se posiciona, junto con la uchuva, la banana *baby* y el tomate de árbol, como una de las frutas de mayor demanda en el ámbito internacional, principalmente en el mercado europeo, como se muestra en la figura 2.

Respecto a la problemática frutícola nacional, los cultivos de gulupa no son la excepción, existe alrededor de un 40% en pérdidas de cosecha, parcialmente asociado al manejo fitosanitario de los cultivos (Orjuela Baquero, Moreno Chacón, Hernández & Melgarejo, 2011, 33). Enfermedades tales como la roña, la secadera, la antracnosis, la mancha de aceite, son algunas de las principales patologías que afectan a estos cultivos.

Plagas como el gusano cosechero, la abeja negra, la mosca del ovario o sonsa, la arañita roja generan daños en las cosechas y postcosechas de esta fruta. Para el control de plagas y enfermedades se han identificado soluciones culturales, etológicas

y de control biológico, sin embargo, el control químico sigue siendo el más utilizado para cultivos de grandes hectáreas.

Actualmente se evidencia la necesidad de utilizar plaguicidas para mejorar la productividad y eficiencia de los cultivos de gulupa, sin embargo, un uso excesivo de estos compuestos, el desconocimiento estacional, de la vida media y de la toxicidad de las sustancias, provoca contaminación de las aguas y los frutos y generan impactos en los cuerpos de agua, mortalidad en los peces y otros seres vivos, daños en la salud humana por procesos de bioacumulación y magnificación, entre otros.

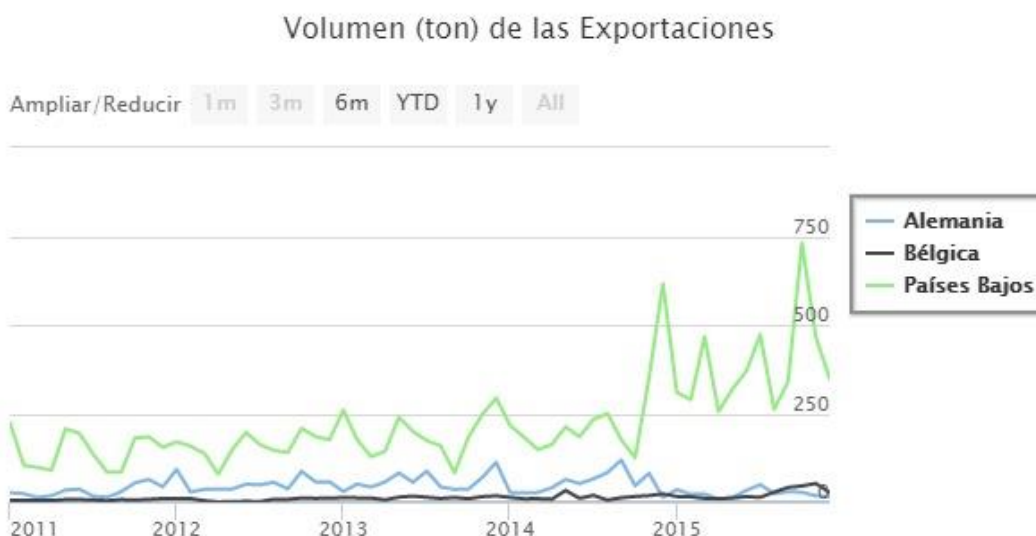


Figura 2. Volumen de exportaciones de gulupa del 2011 al 2015

Fuente: (Asociación Nacional de Comercio Exterior, 2016, 2)

Se estima que solo 1% del volumen total de plaguicida aplicado en el cultivo alcanza su objetivo. Entre el 99% restante, un 25% es retenido en el follaje, un 30% llega al suelo y un 44% se difunde en la atmósfera y en los sistemas acuáticos por escorrentía y lixiviación (Gimenez, Puyuelo, & Medina, 2013, 72)

Algunos de los componentes químicos más empleados para el control de plagas y enfermedades de gulupa son el spinetoram, el tiaclopid, la deltametrina, el clorfenapir, la ciromazina, el fosetyl al 80 wp, el difenoconazol, el azoxistrobin, el difenoconazole, el boscalid, el miclobutanil³. Sin embargo, según datos recolectados en campo, esta lista se amplía a compuestos como el tebuconazol, el triadimenol, la fenhexamida, el trifloxistrobin, la azadiractina, el spinosad, el spiromesifen, la abamectina, entre otros.

Preparación de la muestra

Debido a la complejidad de las matrices en las que se encuentran los plaguicidas y a los límites tan bajos a los que se debe llegar, pues la legislación así lo estipula, se debe realizar una preparación eficiente y eficaz de la muestra, así como poseer un sistema de identificación y detección a nivel de trazas; aspectos cruciales en un método analítico para la determinación de residuos de plaguicidas.

El pretratamiento de la muestra se puede dividir en tres etapas que pueden llevarse a cabo simultánea o secuencialmente:

³ Datos suministrados en entrevista: Juan Giraldo, Secretario de Agricultura del peñol, 2014

- Extracción: para aislar los analitos de la matriz.
- Preconcentración: que normalmente se realiza eliminando parte del disolvente por evaporación.
- Limpieza o *clean-up*: permite eliminar posibles interferencias de la matriz que pueden impedir la correcta determinación de los analitos.

Entre las técnicas más habituales de preparación de muestras, y en particular para la extracción de plaguicidas orgánicos, se destacan la extracción líquido-líquido (*Liquid Liquid Extraction* -LLE) (Queiroz, Lazou, Sandra & Jardim, 2004, 57), la extracción en fase sólida (*Solid Phase Extraction* -SPE) (Demoliner et al., 2010, 1425-1426; Kouzayha et al., 2012, 258), esta técnica es utilizada para la detección en frutas y vegetales (Yang et al., 2011, 856) y jugos (Shamsipur, Yazdanfar & Ghambarian, 2016, 290-291) y la microextracción en fase sólida (*Solid Phase Micro-Extraction* -SPME) (Li, Gan, Peng, Huang & Yu, 2010, 183-184) que se usa para determinar estos analitos en jugos de frutas y vegetales (Arvand, Bozorgzadeh & Shariati, 2013, 76), en repollo, col rizada y mostaza (Sapahin, Makahleh & Saad, 2014, 4), en jugos naturales y comerciales de frutas (Cortes-Aguado, Sanchez-Morito, Arrebola, Garrido-Frenich, & Martinez-Vidal, 2008), entre otros. De manera menos habitual se utilizan otras técnicas como la extracción asistida por microondas (MAE) utilizada en la determinación de organofosforados en alimentos grasos (Chung & Chen, 2011, 5556) y la determinación de organoclorados en plantas medicinales (Zhu et al., 2013, 5 y 11); la extracción con disolventes a presión (PLE o ASE) utilizado en muestras de pescado (Choi, Lee & Jung, 2016, 2 y 4) y en el análisis de residuos de pesticidas en frutas (Celeiro et al., 2014, 19 y 25) y en matrices ambientales y, finalmente, la extracción en el punto de

nube (CPE) (Grimalt & Dehouck, 2016, 14).

En los últimos años se ha desarrollado una nueva técnica de preparación de muestras sólidas (frutas y verduras), denominada QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) por sus siglas en inglés, para el análisis multiresiduo de plaguicidas (Anastassiades, Scherbaum & Mack, 2003, 5-6). Esta técnica comprende varias etapas:

- Extracción de la muestra sólida con un disolvente adecuado.
- Partición líquido-líquido tras la adición de NaCl y MgSO₄
- Limpieza y eliminación del agua residual mediante extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE), al añadir alguno de los componentes utilizados para dicho propósito (amina primaria PSA, carbono grafitizado GCB y C18) y MgSO₄.

Este procedimiento se ha aplicado en numerosas ocasiones para la determinación de plaguicidas en muestras sólidas, principalmente alimentarias, frutas y vegetales (Afify, Mohamed, El-gammal & Attallah, 2010, 603), jugos de naranja (Rizzetti et al., 2016, 26 y 31), pescado (Rawn, Judge & Roscoe, 2010, 2526-2527) entre otros, también mediante GC (Hercegová, Dömötöróvá, Kružlicová & Matisová, 2006, 1103-1104) y en algunos casos mediante LC (Martínez & Garrido, 2006, 244-245); estas dos técnicas de análisis son utilizadas en la separación de los analitos de interés.

Varios autores han comparado la eficiencia de los QuEChERS con otros métodos de extracción confrontando los porcentajes de recuperación obtenidos y los límites de cuantificación, siendo mucho más bajos para los QuEChERS que para el

resto de las técnicas como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Comparación de diferentes métodos de extracción para la cuantificación de pesticidas

| Muestra | Pesticidas | Método | % de Recuperación | LD y/o LC ug/kg | Técnica cromatográfica | Referencia |
|--|------------|--|-------------------|-----------------|------------------------|-----------------------------|
| Hojas de mate | 33 | Extracción asistida por microondas (MAE) | 70-118 | LD 200 | GC-FID | (Pareja et al., 2015) |
| | 27 | QuEChERS | 70-120 | LD 40 | | |
| Tomate | 6 | QuEChERS | 71-111 | LC 12.7-50 | GC-MS | (Moura Andrade et al, 2011) |
| Maíz, harina de trigo y arroz | 219 | QuEChERS | 70-120 | LC 5-50 | GC-MS/MS | (He et al., 2015) |
| Jugos de fruta (limón, manzana, durazno y naranja) | 8 | Micro-extracción en fase sólida con barra magnética (MSB-LPME) | 81.3-104.6 | LC 0.09-0.32 | GC-MS | (L. Wu et al., 2015) |
| Frutas y vegetales | 60 | Extracción en fase sólida (SPE) | 74-111 | LC 0.8-11.8 | UHPLC/TOF-MS | (Sivaperuma I et al., 2015) |
| Repollo | 183 | QuEChERS | 70-120 | LC 0.16-20 | LC-MS/MS | (Zhao et al, 2014) |
| Pepino | | | | LC 0.06-21 | | |

LD: límite de detección, LC: límite de cuantificación.

Lo anterior permite notar que los QuEChERS, como técnica de preparación de muestras, logra determinar gran número de analitos, niveles de concentración muy bajos y aplicar su uso tanto a LC como GC.

Técnica de análisis

La cromatografía constituye la herramienta instrumental de mayor aplicación para la determinación de contaminantes orgánicos, especialmente los pesticidas. Actualmente su uso se fortalece con su acople a detectores de masas, lo que garantiza determinaciones repetibles y veraces.

Tradicionalmente, las técnicas más utilizadas han sido la LC y la GC usando detectores de ultravioleta (UV) (Heidari & Razmi, 2012), fluorescencia (FD) (Mughari, Vázquez, & Galera, 2007) o espectrometría de masas (MS) (Sinha, Vasudev, & Vishnu Vardhana Rao, 2012) en el primer caso, y detectores de nitrógeno-fosforo (NPD) (Salemi, Rasoolzadeh, Nejad, & Vosough, 2013), de llama (FID) (de Souza Pinheiro & de Andrade, 2009), captura de electrones (ECD) (X. Zhao et al., 2016) y MS (Wu et al., 2011).

La GC es la más utilizada en el análisis de estos compuestos, debido a su alta sensibilidad, selectividad y a la posibilidad de separar una gran cantidad de compuestos simultáneamente. Sin embargo, la determinación por GC presenta ciertas limitaciones, tanto en la preparación de la muestra -imposibilidad de inyectar muestras acuosas- como en el tipo de analitos a determinar -que sean estables térmicamente, analitos de baja polaridad y altamente volátiles-, lo que hace que la determinación de compuestos muy polares impulse el uso y desarrollo de la cromatografía líquida.

La LC, inicialmente, con sus detectores UV o FD presenta limitaciones: una es la aplicación limitada a compuestos que absorban en la región ultravioleta o que fluorescan. Otra limitación es la baja sensibilidad pues necesita una etapa de

concentración y, finalmente, su baja especificidad, lo que imposibilita su confirmación, por lo que estos métodos podrían ser útiles como métodos de cribado o *screening*.

En los últimos años, tanto la GC como la LC han hecho uso de MS como sistemas de detección siendo la LC-MS la técnica que solventa los problemas existentes en GC-MS y LC-UV. De esta manera es posible determinar algunos plaguicidas mediante inyección directa de muestras acuosas y la técnica logra ser completamente confirmatoria.

Independientemente de las ventajas que tiene la LC-MS frente a la GC-MS, el acoplamiento LC-MS presentaba inicialmente sus limitaciones debido al uso de interfaces a presión atmosférica (API) que restringían su aplicación a compuestos con puntos susceptibles de desprotonación. Por ello se han desarrollado nuevas interfaces que han permitido el análisis de compuestos impensables hasta el momento por LC-MS. Estas interfaces son la de ionización química a presión atmosférica (APCI) y *electrospray* (ESI) (Abián, Carrascal, & Gay, 2008, 22-23). En ambas interfaces las especies que se detectan principalmente son $[M-H]^+$, cuando una molécula toma un protón del medio (compuestos básicos) y $[M-H]^-$, cuando una molécula dona un protón al medio (compuestos ácidos) (Stashenko & Martínez, 2009, 23-24). De esta manera el modo de ionización se elegirá de acuerdo con las características físico-químicas de los compuestos. Además de estos iones, en el caso de la ionización positiva se pueden formar aductos de otras especies presentes en el medio, como lo son el sodio, el amonio y el potasio.

Un espectrómetro de masas se compone de una fuente de iones, un analizador de masas y un detector, siendo los dos últimos operados bajo condiciones de alto vacío (la fuente de iones no necesariamente estará bajo vacío) y convierte las moléculas de analito a un estado cargado (ionizado), con análisis subsiguiente de los iones y cualquier ión fragmento que se produce durante el proceso de ionización, en función de su relación masa/carga (m/z) (Pitt, 2009, 20) . Para el caso de este trabajo se utiliza como fuente de iones la fuente de ionización por *electrospray* (ESI) y como analizador un triple cuadrupolo (QqQ), su funcionamiento se detalla a continuación.

Cuando se usa la interfase ESI, la muestra en solución se hace pasar a través de un capilar a presión atmosférica al que se aplica un alto potencial eléctrico, (típicamente 3-4 kV para la producción de iones positivos; ligeramente inferior y de polaridad opuesta para la producción de iones negativos). Este alto voltaje dispersa la corriente de líquido, formándose gotas altamente cargadas (nebulización), que son desolvatadas por una corriente de gas caliente (nitrógeno), hasta el punto en que su tamaño es tan reducido, que las fuerzas coulombianas de repulsión son capaces de vencer la tensión superficial, momento en que los iones escapan a la fase gaseosa denominándose a este proceso evaporación iónica ("explosión coulombica") para finalmente ser transferidos a través de una serie de lentes focalizadoras hacia el espectrómetro de masas (Ibañez, 2007, 34-35).

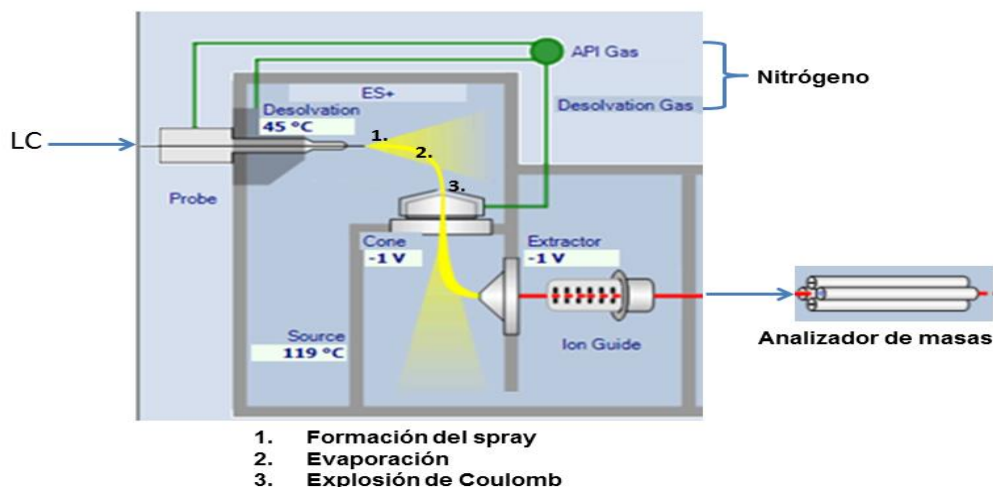


Figura 3. Esquema de la fuente de ionización ESI.

Fuente: propia, equipo Xevo TQD

Una vez superada la interface, la continuación del proceso supone hacer pasar los iones a través de un analizador de masas, el cual funcionara como filtro. En este caso el analizador que se utiliza es un triple cuadrupolo, este consta de cuatro barras concéntricas paralelas dispuestas en forma de cuadrado (Ver figura 4). Los iones del analíto son direccionados hacia el centro del cuadrado. Sobre estos cilindros se aplican (dos a dos) voltajes de corriente continua (DC) y de radiofrecuencia (RF) para generar campos electromagnéticos. Estos campos determinan cual relación masa/carga de iones puede pasar a través del filtro en un tiempo determinado, de esta manera los iones describen un camino que depende directamente de esta relación. A un valor específico de DC y RF, sólo los iones con una particular relación m/z siguen una trayectoria estable a través de las barras y alcanzan el detector, mientras que las demás masas, al tener una trayectoria inestable, no alcanzan el detector, siendo desviadas fuera del conjunto de barras (Bustos, 2012, 4-5; Ibañez, 2007, 40-43; Pitt,

2009, 20-22).

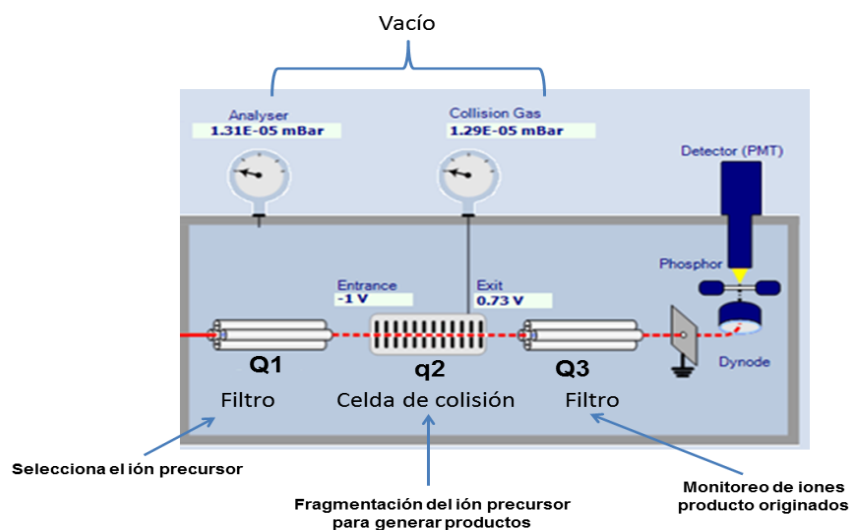


Figura 4. Esquema de un triple cuadrupolo

Fuente: propia, equipo Xevo TQD

Validación de métodos analíticos

La validación de un método constituye un paso clave en la entrega de los resultados, pues con ello se busca que estos sean idóneos y confiables.

Así la validación permitirá demostrar con un alto grado de confianza, y mediante evidencia documentada que un proceso específico producirá resultados consistentes y permanentes que están de acuerdo con las características de calidad definidas.

Durante la validación de métodos, los parámetros y criterios de aceptación para los controles de idoneidad del sistema y comprobaciones de control de calidad deben ser definidos. En este sentido la validación incluye parámetros como: especificidad y selectividad, linealidad, límite de detección y cuantificación, exactitud, precisión, robustez (opcional) e incertidumbre (Commission, 2016; Morillas, 2016).

En Latinoamérica se tienen infraestructuras de calidad (IF) muy definidas para algunos países y en términos generales como pilares de estas se encuentran: los institutos de metrología, los institutos de normalización y los organismos de acreditación, todos actores clave en el desarrollo de calidad de los laboratorios de ensayo y calibración.

En la siguiente figura se muestran las interrelaciones entre los diferentes componentes de la IF, la cadena de valor y el sistema internacional.

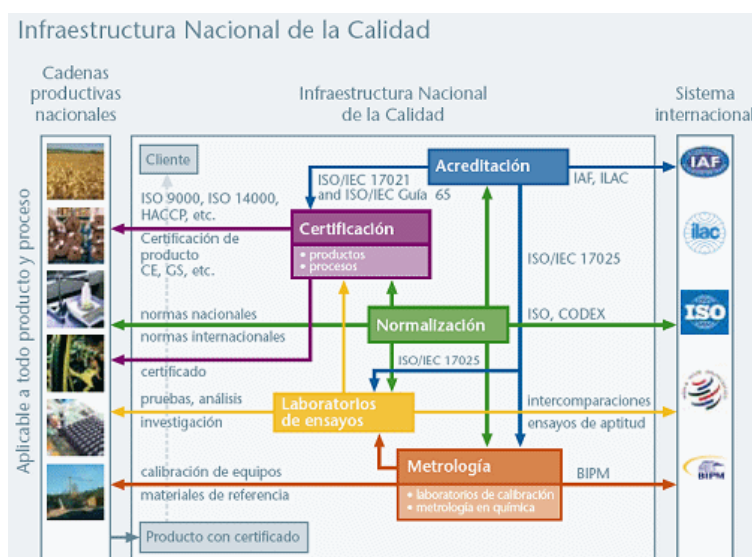


Figura 5. Infraestructura nacional de calidad.

Fuente red nacional de metrología.

En Colombia, sin embargo, aún no existen organismos reguladores en el marco de la validación de métodos analíticos. Por lo tanto, el procedimiento de validación debe ser realizado de acuerdo con organismos internacionales, tales como: SANTE/11975:2015, ISO 17025: 2005 o Eurachem CNM- MRD- 030 - 2ª edición. Algunos de los parámetros involucrados en el proceso de validación de métodos

analíticos para la determinación de residuos de plaguicidas se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 6. Parámetros evaluados durante la etapa de validación de métodos analíticos para determinación de residuos de plaguicidas.

| Parámetro | Referencia | Definición | Criterio |
|-------------------------------|----------------|---|--|
| Selectividad | Eurachem | Distinción de respuesta entre analitos. | Extracción de “blanco” matriz |
| Especificidad | SANTE | Distinción de la respuesta del analito en presencia de interferentes. | Extracción de “blanco” matriz |
| Linealidad y rango de trabajo | Eurachem | Correlación entre respuesta analítica y concentración | Curva Analítica ($y = ax + b$) |
| Efecto Matriz | SANTE | Influencia de los componentes de la matriz en la respuesta (área) | Comparación entre curvas preparadas en solvente y en extracto blanco de matriz |
| LOD | Eurachem | Concentración límite del analito distinta del ruido. | S/R = 3 |
| LOQ | | | S/R = 10 |
| Precisión | Eurachem/SANTE | Proximidad de resultados obtenidos por diferentes análisis. | Repetibilidad y precisión intermedia |
| Exactitud | SANTE | Proximidad de resultado en relación con una referencia | Pruebas de dopaje |
| Robustez | Eurachem | Prueba de variaciones pequeñas pero deliberadas | Comparación de recuperaciones obtenidas |

Fuente: propia

Materiales y métodos

El trabajo propuesto consistió en la estandarización y validación de un método cromatográfico y de preparación de muestra para la determinación de residuos de plaguicidas en gulupa por UPLC MS/MS. Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Trazabilidad y Residualidad (TrazaR) de la Corporación Universitaria Lasallista. Los instrumentos, equipos, reactivos usados y procedimiento se describen a continuación:

Instrumentos

Los equipos utilizados en el desarrollo de este trabajo fueron:

- ✓ Sistema de purificación de agua, PureLab Ultra (Elga, Inglaterra);
- ✓ Centrífuga refrigerada, cónsul 21R (Ortoalresa, España);
- ✓ Agitador Vortex Mixer (Fisher Scientific, Estados Unidos);
- ✓ Procesador de alimentos kitchenaid (Whirlpool, Estados Unidos);
- ✓ Balanza analítica AUW-220D (Shimadzu, Japón);
- ✓ Transfer pipetas con capacidad variable (Brand, Alemania);
- ✓ Sistema UPLC MS/MS, modelo Xevo TQD TM (Waters, EE.UU.), que contiene: analizador triple cuadrupolo, muestreador automático sample manager (Acquity); sistema de adquisición de datos MassLynx V 4.1; el sistema generador de nitrógeno PEAK, el modelo NM30L-MS (Peak Scientific, Escocia) y el gas argón 5.0, utilizado como gas de colisión.
- ✓ Columna analítica ACQUITY UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 μ m);

Reactivos, solventes y demás materiales utilizados

Los reactivos, disolventes y demás materiales utilizados se enumeran a continuación:

- ✓ Estándares sólidos y líquidos de los compuestos en estudio (Dr. Erhenstorfer, Alemania; Sigma Aldrich, Estados Unidos);
- ✓ Acetonitrilo grado LC-MS (Merck, Alemania)
- ✓ Ácido fórmico >99% (Merck, Alemania.);
- ✓ Agua purificada en sistema Purelab Ultra (resistividad de 18,2 MΩ cm);
- ✓ Formiato de amonio (Sigma Aldrich, Estados Unidos.);
- ✓ Tubos de polipropileno, con tapas, de 50 mL (Nest, China);
- ✓ Sobres de extracción con la siguiente mezcla de sales (Q-sep-Restek, Estados Unidos):
 - 4 g MgSO₄, 1 g NaCl
 - 4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g TSCD, 0.5 g DHS
 - 6 g MgSO₄, 1.5 g NaOAc
- ✓ Tubos de limpieza, para 1 mL de extracto (d-SPE-Restek, Estados Unidos) con los siguientes compuestos:
 - 150 mg de MgSO₄, 25 mg de PSA
 - 150 mg de MgSO₄, 25 mg de PSA, 25 mg de C18-CE
 - 150 mg de MgSO₄, 25 mg de PSA, 2,5 mg de GCB
 - 150 mg de MgSO₄, 25 mg de PSA, 7,5 mg de GCB
 - 150 mg de MgSO₄, 50 mg de PSA, 50 mg de C18-CE
 - 150 mg de MgSO₄, 50 mg de PSA, 50 mg de GCB

- 150 mg de MgSO_4 , 50 mg de PSA, 50 mg de C18-EC, 7,5 mg de GCB
- ✓ Filtros de nylon de 13 mm y porosidad de 0,2 μm (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos)
- ✓ Frascos de vidrio (vial), capacidad de 2 mL (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos)
- ✓ Balones volumétricos clase A (Duran, Alemania)
- ✓ Material de vidrio común del laboratorio

Preparación de soluciones

Los plaguicidas analizados en este trabajo fueron seleccionados principalmente de acuerdo con los compuestos que utilizan los agricultores en sus cultivos los cuales se conocieron de entrevistas realizadas a ellos, y los límites residuales se establecieron con base en los regulados por la Unión Europea.

Los patrones fueron preparados individualmente a través de las soluciones analíticas de concentración 1000 mg/L de cada compuesto, considerando la pureza de los patrones sólidos. La masa del patrón sólido pesado fue disuelta en metanol y las soluciones stock fueron almacenadas en frascos ámbar a temperatura de $-18\text{ }^\circ\text{C}$. A partir de estas soluciones, se preparó una mezcla que contenía todos los plaguicidas a una concentración de 10 mg/L, otra de 1 mg/L y otra de 0,1mg/L, todas preparadas en acetonitrilo.

Para la inyección en el sistema UPLC-MS/MS, se prepararon soluciones en las concentraciones 5,0; 10,0; 15,0; 50,0; 100,0, 300,0 y 500,0 $\mu\text{g/L}$, en acetonitrilo y en el

extracto de matriz. La Tabla 7 presenta información de los compuestos analizados, con sus respectivas purzas, clase, fórmula molecular, pKa y logKow.

Tabla 7. Información relevante de los compuestos utilizados en este trabajo.

| Analíto | Clase | Formula molecular | Grupo | pKa | log Kow |
|-----------------|-------|--|-----------------------|------|---------|
| 2,4 D | H | C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃ | Alquil Clorofenoxi | 3,4 | -0,82 |
| Abamectina | A/I/N | C ₄₈ H ₇₂ O ₁₄ + C ₄₇ H ₇₀ O ₁₄ | Avermectina | - | 4,4 |
| Azoxistrobin | F | C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅ | Estrobilurina | - | 2,5 |
| Boscalid | F | C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O | Carboxamida | - | 2,96 |
| Cimoxanil | F | C ₇ H ₁₀ N ₄ O ₃ | Cianoacetamida oxima | 9,3 | 0,67 |
| Ciromacine | I | C ₆ H ₁₀ N ₆ | Triazina | 5,22 | 0,069 |
| Difenoconazol | F | C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃ | Triazol | 1,07 | 4,36 |
| Etofenprox | I | C ₂₅ H ₂₈ O ₃ | Piretroide | - | 6,9 |
| Etoprofós | A/N | C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₂ | Organofosforado | - | 2,99 |
| Fenhexamide | F | C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ NO ₂ | Hidroxianilida | 7,3 | 3,51 |
| Fipronil | I | C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS | Fenilpirazol | - | 3,75 |
| Linuron | H | C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂ | Urea | - | 3,00 |
| Malation | I | C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂ | Organofosforado | - | 2,75 |
| metamidofos | I/A | C ₂ H ₈ NO ₂ PS | Organofosforado | - | -0,79 |
| metomil | I/A | C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S | Carbamato | - | 0,09 |
| Miclobutanil | I | C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄ | Triazol | 2,3 | 2,89 |
| Ofurace | F | C ₁₄ H ₁₆ ClNO ₃ | Fenilamida | - | 1,39 |
| Picloram | H | C ₆ H ₃ Cl ₃ N ₂ O ₂ | Compuesto de piridina | 2,3 | -1,92 |
| Profenofós | A | C ₁₁ H ₁₅ BrClO ₃ PS | Organofosforado | - | 1,7 |
| spinetoram | I | C ₄₂ H ₆₉ NO ₁₀ + C ₄₃ H ₆₉ NO ₁₀ | Mezcla de spinosym | 7,7 | 4,2 |
| Spinosad A | I | C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₀ | Lactona macrocíclica | 8,1 | 4 |
| Spinosad D | I | C ₄₂ H ₆₇ NO ₁₀ | Lactona macrocíclica | 7,87 | 4,5 |
| Spiromesifen | I | C ₂₃ H ₃₀ O ₄ | Ácido tetrónico | - | 4,55 |
| Tebuconazol | F | C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O | Triazol | - | 3,7 |
| Triadimefon | F | C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂ | Triazol | - | 3,18 |
| Triadimenol | F | C ₁₄ H ₁₈ ClN ₃ O ₂ | Triazol | - | 3,18 |
| Trifenilfosfato | RF | C ₁₈ H ₁₅ O ₄ P | Organofosforado | - | 4,59 |

| | | | | | |
|--|----|-------------------------|-----------------|---|------|
| (ES) | | | | | |
| Tris (1,3-dicloroisopropil) fosfato (EI) | RF | $C_9H_{15}Cl_6O_4P$ | Organofosforado | - | 3,65 |
| Trifloxistrobin | F | $C_{20}H_{19}F_3N_2O_4$ | Estrobilurina | - | 4,5 |

Dónde: A= Acaricida; F = Fungicida; RF: Retardante de llama; H = Herbicida; I = Insecticida; N = Nematicida; ES = Estándar sustituto; EI= estándar Interno.

Fuente: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/atoz.htm> consultada el 23 de octubre de 2017

Estándar interno y sustituto (surrogate)

Estos compuestos se añaden en diferentes etapas del procedimiento analítico, antes de la extracción (estándar sustituto, ES) y en el extracto final (estándar interno, EI) y tienen como objetivo asegurar la ejecución correcta del procedimiento de extracción y de análisis en el sistema cromatográfico, respectivamente. De esta manera los patrones utilizados, ayudan a minimizar fuentes de errores, además mejoran la robustez del método, corrigiendo varios factores dentro del procedimiento analítico que pueden tener un impacto sobre los resultados del análisis (European Commission- SANTE, 2015).

Se utilizó como EI el compuesto Tris-(1,3-dicloroisopropil)-fosfato a una concentración de 30 µg/L. El ES fue trifenilfosfato y se adiciono en las muestras y en los dopajes a una concentración de 50 µg/L.

Muestras de gulupa

Las muestras "blanco" de gulupa utilizadas para la optimización y la validación del método se cultivaron exentas de los compuestos evaluados, en una finca del suroeste de Antioquia, en las cuales se evitó estrictamente el uso de aditivos químicos

o cualquier otra sustancia que contenga materiales sintéticos, tales como pesticidas, herbicidas y/o fertilizantes artificiales, adicional se verificaron con un scanning de los compuestos de estudio.

Las frutas enteras, fueron procesadas y homogeneizadas con ayuda de un procesador de alimentos, conforme a lo descrito en el Codex Alimentarius (Codex, 2004, 17). Después del procesamiento, las muestras fueron almacenadas en tubos de centrifuga de polipropileno debidamente identificados, y mantenidas en congelación a -18°C hasta su utilización.

En la etapa de aplicabilidad del método se adquirieron 16 muestras provenientes de fincas del oriente y suroeste Antioqueño cuyos productores eran beneficiarios del proyecto.

Condiciones optimizadas en el sistema UPLC-MS/MS

Las pruebas se realizaron empleando cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a la espectrometría de masas en serie (UPLC-MS/MS), debido a que esta técnica proporciona ventajas significativas con relación a la sensibilidad, selectividad y velocidad de análisis. Además, la capacidad de medir compuestos a niveles de trazas y diferenciar moléculas con diferentes masas y patrones de fragmentación hacen de UPLC-MS/MS una poderosa herramienta analítica (Ahumada & Zamudio, 2011, 228).

Optimización de las transiciones

Esta se realizó infundiendo directamente en el espectrómetro cada plaguicida por separado, a partir de estas infusiones, se realizó el monitoreo del ión precursor de cada compuesto en el cuadrupolo 1 (Q1) y la exploración del ion producto en el cuadrupolo 3 (Q3), variando las energías de colisión. Así, se seleccionó el modo de ionización de la fuente (ESI +/-), voltaje del capilar y las energías de colisión para fragmentar el ion precursor y generar iones productos.

Luego de la obtención de las transiciones para cada compuesto, el sistema cromatográfico operó en el modo MRM con el fin de evaluar las transiciones a ser utilizadas para la cuantificación (transición de mayor intensidad) y para la confirmación (segunda de mayor intensidad) de los compuestos estudiados. Finalmente, se realizó el análisis de una mezcla con todos los plaguicidas a utilizar a una concentración 100 µg/L en acetonitrilo, a fin de verificar el tiempo de retención de los analitos y la intensidad de la señal analítica.

Optimización de fases móviles y gradientes

Para desarrollar esta parte se realiza la comparación de diferentes fases móviles con y sin adición de modificadores orgánicos que facilitan la ionización, la revisión bibliográfica permite evidenciar que las fases móviles que contienen los modificadores ácido fórmico y formiato de amonio proporcionan mejores resultados para el análisis de residuos de pesticidas empleando UPLC-MS/MS, pues esto aumenta la eficiencia de ionización (Delgado-Zamarreño, Pérez-Martín, Bustamante-

Rangel, & Carabias-Martínez, 2012, 321-322; Kemmerich et al., 2014, 3), como solventes se utilizan: agua, acetonitrilo y metanol. Luego de encontrar la fase móvil óptima se realiza la determinación del mejor gradiente teniendo en cuenta lo siguiente:

Tabla 8. Evaluación de la fase móvil para el desarrollo del método.

| Prueba | Composición inicial de fase móvil A: fase móvil B |
|--------|--|
| T1 | 95:5 |
| T2 | 90:10 |
| T3 | 85:15 |

Teniendo en cuenta el siguiente gradiente para cada una de las pruebas descritas

| Tiempo (min) | %A | %B |
|--------------|----|-----|
| Inicial | 95 | 5 |
| 0,25 | 95 | 5 |
| 7,75 | 0 | 100 |
| 8,5 | 0 | 100 |
| 8,51 | 95 | 5 |
| 16 | 95 | 5 |

Donde A es fase acuosa con los modificadores y B es el solvente orgánico sin modificador

Optimización del método QuEChERS para la determinación de pesticidas en gulupa

En este estudio se probaron las diferentes versiones del método QuEChERS original, AOAC y Europeo (Lehotay, Mastovska, & Lightfield, 2005) utilizados tanto en la cascara como en la pulpa de la gulupa, con el fin de evaluar el mejor procedimiento de preparación de muestra en términos de recuperaciones y efecto de matriz. Para el procesamiento de las muestras, se pesaron $10,00 \pm 0,01$ g de muestra en un tubo de polipropileno de 50 mL. Después, se realizó dopaje ($n = 3$) a un nivel de $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ y se

agitó en vórtex por 1 min. Posteriormente, se le agregaron 10 mL de acetonitrilo acidificado pues la revisión bibliográfica permite evidenciar que se presentan mejores recuperaciones cuando el solvente se acidifica (Maštovská & Lehotay, 2004) y se realizó nuevamente la agitación en vórtex por 1 min. A continuación, se añadieron cantidades adecuadas de sales para cada procedimiento:

- QuEChERS original denominado E1: 4,0 g de MgSO₄ y 1,0 g de NaCl.
- QuEChERS AOAC denominado E2: 6,0 g de MgSO₄ y 1,5 g de CH₃COONa.
- QuEChERS europeo denominado E3: 4,0 g de MgSO₄, 1,0 g de NaCl, 1,0 g de citrato de sodio dihidratado y 0,5 g de citrato de sodio sesquihidrato.

Después de la adición de las sales, los tubos fueron agitados durante 1 min y centrifugados a 5000 rpm durante 15 min, a 25°C. Luego se pasa a la etapa de limpieza, en esta se probaron diferentes procedimientos (L1-L7) con cada uno de los extractos obtenidos de la etapa anterior, todos y cada uno probados para 1,0 ml de extracto, se agitan vigorosamente 1 minuto y se centrifugan 5 min a 10000 rpm, finalmente se toma una alícuota de 500 uL y se mezclan con 500 uL de fase móvil.

L1: 150 mg de MgSO₄, 25 mg de PSA

L2: 150 mg de MgSO₄, 25 mg de PSA, 25 mg de C18-CE

L3: 150 mg de MgSO₄, 25 mg de PSA, 2,5 mg de GCB

L4: 150 mg de MgSO₄, 25 mg de PSA, 7,5 mg de GCB

L5: 150 mg de MgSO₄, 50 mg de PSA, 50 mg de C18-CE

L6: 150 mg de MgSO₄, 50 mg de PSA, 50 mg de GCB

L7: 150 mg de MgSO₄, 50 mg de PSA, 50 mg de C18-EC, 7,5 mg de GCB

En el proceso de optimización se evaluó y eligió aquel que diera la mayor respuesta y que estuviese dentro de los límites permitidos de recuperación.

Validación del método para el análisis de pesticidas en gulupa

Para dar cumplimiento a la validación del método se tienen en cuenta los siguientes parámetros:

Selectividad, rango lineal, Límites de detección y cuantificación, Efecto de matriz, Exactitud (porcentaje de recuperación) y precisión (repetibilidad y precisión intermedia).

Selectividad

La selectividad del método fue evaluada comparando los cromatogramas obtenidos con las inyecciones en el sistema UPLC-MS / MS de extractos de muestras "blanco", es decir, extracto libre de los compuestos de interés y de la muestra fortificada con estos compuestos.

Curva de calibración y rango lineal

Las curvas de calibración fueron preparadas en el solvente y en el extracto de la matriz de gulupa, con 7 niveles de concentración 5,0; 10,0; 15,0; 50,0; 100,0, 300,0 y 500,0 $\mu\text{g/L}$, fueron preparadas 3 días diferentes e inyectadas una vez según la recomendación de la guía SANTE, posteriormente se evaluó el coeficiente de determinación (r^2) y los valores de residuales para cada uno de los niveles los cuales deben tener valor de $r^2 \geq 0,95$ y residuales $< 20\%$ respectivamente. Los datos de regresión se obtuvieron con ayuda del software (MassLynx V 4.1) del equipo.

Efecto Matriz

La evaluación del efecto de matriz se realizó por la comparación entre las pendientes de las curvas de calibración de los estándares preparados en el solvente (acetonitrilo) y las preparadas en el extracto de la matriz (Ferrer, Lozano, Agüera, Girón, & Fernández-Alba, 2011). Para el cálculo se utiliza la siguiente ecuación:

$$\% \text{ efecto matriz (EM)} = \frac{m_E - m_s}{m_s} \times 100$$

m_E = pendiente de la curva de calibración preparada en extracto de matriz.

m_s = pendiente de la curva de calibración preparada en solvente (acetonitrilo).

El cual resulta poco significativo si se encuentra entre +/- 20% (Domínguez, Placencia, Cereceda, Fadic, & Quiroz, 2014, 153)

Límite de detección y límite de cuantificación

Los límites de cuantificación del método LOQm (en µg/L) fueron establecidos experimentalmente como la menor concentración de la matriz dopada que presentó resultados de recuperación entre 70 y 120%, con CV% menor o igual al 20%, de acuerdo con la norma SANTE/11945/2015 (European Commission- SANTE, 2015). Los valores de LODm fueron obtenidos con la siguiente ecuación:

$$LOD_m = \frac{SD_{LOD}}{m} \times 3$$

SD_{LOQ} = desviación estándar de las soluciones al nivel del límite de cuantificación.

m = pendiente de la curva de calibración.

Porcentaje de recuperación para la evaluación de la exactitud

Para el estudio de la exactitud del método, se utilizaron pruebas de dopaje, evaluándose de esa manera, la recuperación de los compuestos. Se doparon muestras "blanco" en tres niveles de concentración (10, 50 y 100 µg/L) con 6 réplicas para cada nivel de fortificación.

La exactitud, expresada en porcentaje de recuperación fue calculada con la ayuda del software (MassLynx V 4.1) del equipo. Conforme a las recomendaciones de la guía de la guía EURACHEM y SANTE, el cálculo de recuperación se realiza de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{C_a - C_b}{C_c} \times 100$$

C_a = Concentración determinada en la muestra dopada;

C_b = Concentración determinada en la muestra sin dopar;

C_c = Concentración utilizada para el dopaje.

Precisión (repetibilidad y Precisión intermedia)

La precisión se puede calcular mediante la fórmula del coeficiente de variación de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\%CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

S = desviación estándar absoluta

\bar{X} = media de las medidas en replicas;

La precisión del método, en términos de repetibilidad (CVr) fue evaluada procediendo con la extracción y análisis de las muestras dopadas a 3 niveles de concentración con $n=6$ para cada nivel e inyectadas por duplicado realizadas por un mismo analista en un mismo día.

La precisión intermedia (CVpi) del método se probó con los mismos tres niveles de recuperación en días diferentes.

Tanto la repetibilidad como la precisión intermedia se realizan de manera independiente.

Robustez

La robustez se evalúa con el método youden-stainer (Inglot, Gumieniczek, Paulina, & Rutkowska, 2013) teniendo como factores de cambio la no acidificación del solvente de extracción, la temperatura de la columna y la composición de la fase móvil.

Aplicación del método.

Finalmente, el método validado fue aplicado en la determinación de residuos de pesticidas en muestras de gulupa provenientes de fincas del oriente antioqueño (Rionegro) y del suroeste antioqueño (Andes y Jardín).

Resultados y discusión

Optimización de condiciones cromatográficas

La intensidad de la señal en LCMS puede estar fuertemente influenciada por la composición de la fase móvil (Kemmerich et al., 2014, 3). Con el fin de optimizar la intensidad de la señal de los pesticidas evaluados en este trabajo, se probaron diferentes composiciones de fases móviles dadas por las tablas 8 y 9 entre las que se incluyen:

- Fase acuosa con formiato de amonio y ácido fórmico como modificadores
- Fase orgánica metanol o acetonitrilo sin modificadores.

Las diferentes fases móviles probadas y la respuesta (área de pico) obtenida para cada compuesto, se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados de la detección para los pesticidas evaluados. Todas las áreas de los picos se normalizaron contra el área de pico máxima lograda para ese compuesto. En consecuencia, el 100% indica el área de pico más alta lograda y se resalta.

| Compuesto | Agua: MeOH | Agua 0.1% AF: MeOH | Agua 5mM Fam:MeOH | Agua: ACN | Agua 0.1% AF:ACN | Agua 5mM Fam:MeC N |
|---------------|---------------|--------------------------|----------------------|--------------|------------------------|-----------------------------|
| 2,4 D | 28 | 56 | 75 | 52 | 100 | 45 |
| Abamectina | 30 | 32 | 69 | 75 | 100 | 89 |
| Azoxistrobina | 27 | 30 | 41 | 69 | 67 | 85 |
| Boscalid | 66 | 100 | 70 | 36 | 78 | 45 |
| Cimoxanil | 100 | 91 | 74 | 54 | 89 | 65 |
| Ciromacine | 66 | 52 | 66 | 34 | 100 | 56 |
| Difenoconazol | 27 | 85 | 41 | 70 | 90 | 100 |
| Etofenprox | 69 | 42 | 74 | 74 | 86 | 100 |
| Etoprofós | 85 | 69 | 88 | 66 | 78 | 100 |
| Fenhexamide | 50 | 47 | 68 | 67 | 100 | 56 |
| Fipronil | 52 | 30 | 65 | 76 | 100 | 76 |
| Linuron | 14 | 35 | 66 | 100 | 67 | 78 |

| | | | | | | |
|------------------|----|-----|----|-----|-----|-----|
| Malation | 27 | 76 | 64 | 74 | 56 | 76 |
| metamidofos | 15 | 81 | 80 | 56 | 88 | 100 |
| metomil | 28 | 100 | 32 | 89 | 69 | 45 |
| Miclobutanil | 72 | 91 | 70 | 90 | 100 | 67 |
| Ofurace | 38 | 40 | 40 | 100 | 89 | 87 |
| Picloram | 33 | 28 | 89 | 62 | 98 | 100 |
| Profenofós | 54 | 24 | 39 | 34 | 100 | 89 |
| spinetoram | 28 | 21 | 38 | 34 | 89 | 100 |
| Spinosad A | 93 | 96 | 28 | 78 | 88 | 100 |
| Spinosad D | 16 | 25 | 31 | 37 | 87 | 100 |
| Spiromesifen | 67 | 17 | 30 | 44 | 100 | 85 |
| Tebuconazol | 24 | 89 | 45 | 89 | 100 | 86 |
| Triadimefon | 17 | 25 | 89 | 79 | 100 | 84 |
| Triadimenol | 74 | 63 | 28 | 44 | 65 | 100 |
| Trifloxistrobina | 38 | 40 | 40 | 34 | 76 | 100 |

Basándose en los resultados de la tabla anterior se analizó otra composición más de formiato de amonio con ácido fórmico. La separación se logró usando una columna Acquity BEH C18 con las siguientes dimensiones 2,1 x 100 mm, 1,7 μ m. Se encontró que la combinación de formiato de amonio 10mM con ácido fórmico al 0,1 % era más efectiva para los compuestos analizados en términos de intensidad, relación señal/ruido y formas de los picos (Fernández, 2017, 39-41). La Figura 6 destaca las excelentes formas de los picos logrados en el equipo Waters Xevo TQD.

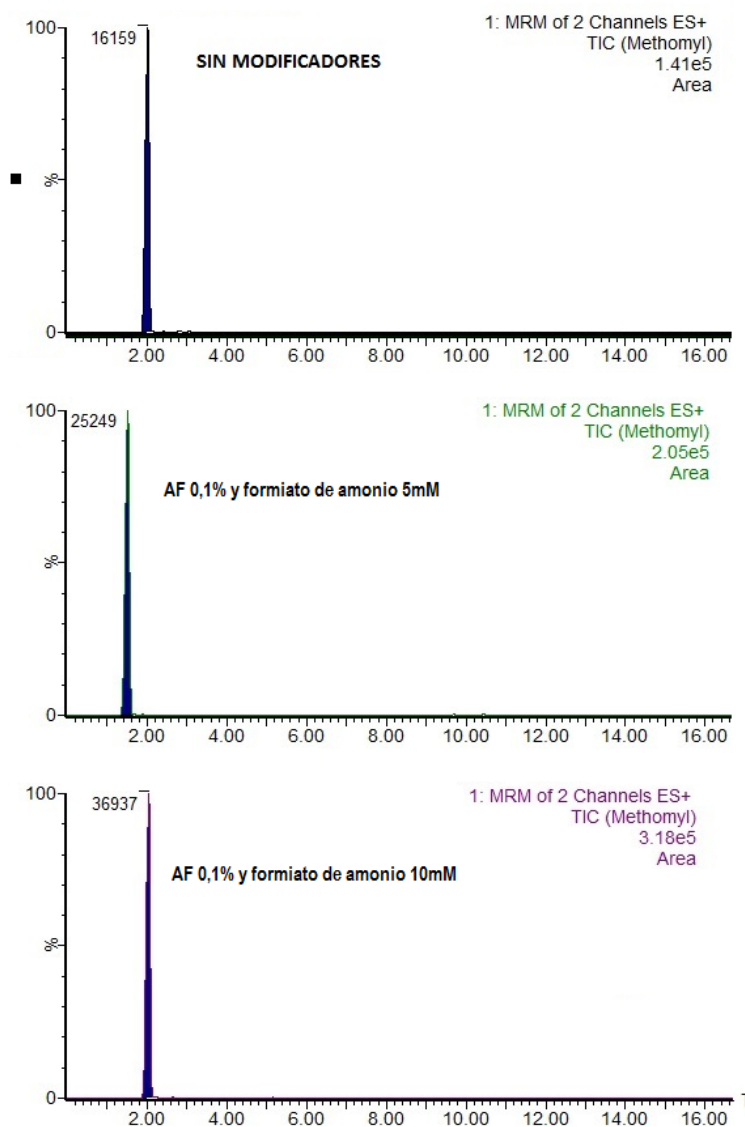


Figura 6. Extracto de gulupa (0,100 mg/kg) inyectado sin modificadores (A), 5mM formiato de amonio (B) y con 10 m M de formiato de amonio (C).

De igual forma se evaluaron la temperatura y el volumen de inyección con el fin de obtener mejores resultados para cada uno de los pesticidas evaluados.

La siguiente tabla resume las condiciones logradas para la separación de los plaguicidas evaluados.

Tabla 10. Condiciones optimizadas para el método en desarrollo.

| PARÁMETROS | UHPLC-MS/MS |
|----------------------|--|
| Columna analítica | ACQUITY UPLC® BEH C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 μ m) |
| Fase móvil | Agua acidificada con 0,1% de ácido fórmico y 10mM de formiato de amonio (A) y acetonitrilo (B) |
| Gradiente | El 85% (A) y el 15% (B) de 0 a 0,25 min, alternando hasta alcanzar el 100% (B) en 7,75 min (permaneciendo hasta 8,50 min); alternando hasta el 85% (A) y el 15% (B) en 8,51 min (permaneciendo hasta 16 min) |
| Flujo de fase móvil | 0,400 mL/min |
| Volumen de inyección | 3 μ L |
| Fuente de ionización | ESI +/- |
| Detector | Espectrómetro de masas, operando en el modo MS/MS |

En la Figura 7 se representa el cromatograma de una muestra blanco dopada a una concentración de 100 μ g/L logrado con las condiciones antes descritas. A pesar de que algunos compuestos tienen tiempos de retención muy próximos, la utilización del UPLC-MS/MS proporcionó alta selectividad y eficiencia en la separación, así como la información estructural. Por lo tanto, fue posible la identificación y cuantificación de todos los compuestos en el estudio.

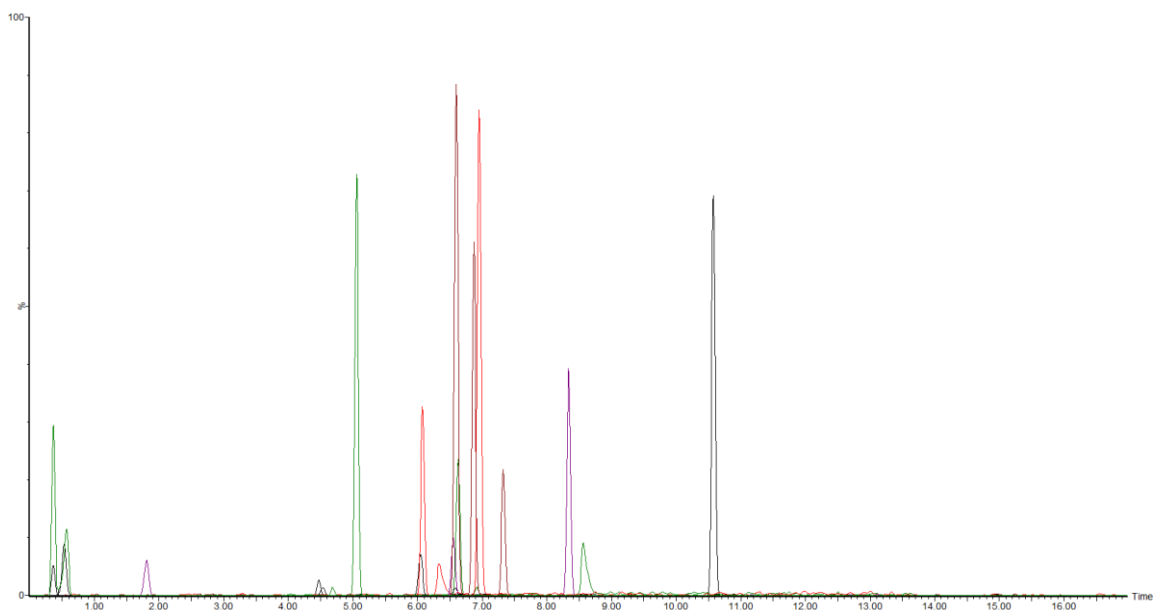


Figura 7. Cromatograma a una concentración de 100 µg/L en una muestra blanco dopada obtenida por UPLC-MS/MS.

Optimización de condiciones espectrométricas

La Tabla 11 presenta los pesticidas que fueron analizados por UPLC-MS/MS, el modo de ionización de cada compuesto, los respectivos tiempos de retención (tR), los iones precursores, los iones producto y la energía de colisión de las transiciones monitoreadas. Para cada compuesto se seleccionaron dos transiciones: la transición más intensa (utilizada para la cuantificación) y la segunda transición más intensa (utilizada como confirmación) (European Commission- SANTE, 2015).

Tabla 11. Pesticidas analizados con sus respectivos tiempos de retención (tR), iones precursor, iones productos y energía de colisión (EC) de las transiciones monitoreadas.

| Analito | Modo de ionización | tR | voltaje del cono | Transición de Cuantificación (EC) | Transición de Confirmación (EC) |
|------------------|--------------------|-------|------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| 2,4 D | ESI (-) | 5,27 | 20 | 218,8>160,9 (16) | 218,8>160,9 (16) |
| Abamectina | ESI (+) | 10,7 | 10 | 890,6>305,2 (25) | 890,6>567,4 (11) |
| Azoxistrobina | ESI (+) | 7,14 | 25 | 404,1>372,2 (25) | 404,1>329,0 (30) |
| Boscalid | ESI (+) | 7,28 | 40 | 342,9>139,9 (45) | 342,9>307,1 (20) |
| Cimoxanil | ESI (+) | 3,4 | 10 | 198,9>127,9 (14) | 198,9>110,8 (20) |
| Ciromacine | ESI (+) | 0,64 | 35 | 167>60,2 (20) | 167>108,1 (20) |
| Difenoconazol | ESI (+) | 8,48 | 40 | 406,1>251,1 (25) | 406,1>111,1 (35) |
| Etofenprox | ESI (+) | 11,92 | 22 | 394,0>176,9 (12) | 394,0>134,9 (30) |
| Etoprofós | ESI (+) | 7,22 | 30 | 242,8>130,8 (22) | 242,8>172,8 (14) |
| Fenhexamide | ESI (+) | 7,31 | 45 | 302,1>97,2 (25) | 302,1>55,3 (35) |
| Fipronil | ESI (-) | 8,42 | 26 | 434,8>249,9 (26) | 434,8>329,9 (14) |
| Linuron | ESI (+) | 6,77 | 36 | 248,9>159,9 (18) | 248,9>181,9 (14) |
| Malation | ESI (+) | 7,75 | 20 | 330,9>126,9 (10) | 330,9>98,9(30) |
| metamidofos | ESI (+) | 0,65 | 30 | 141,7>93,9 (12) | 141,7>124,8 (12) |
| metomil | ESI (+) | 1,66 | 20 | 162,9>106,0 (12) | 162,9>87,4 (14) |
| Miclobutanil | ESI (+) | 7,18 | 35 | 289,1>124,9 (30) | 289,1>150,9 (25) |
| Ofurace | ESI (+) | 5,57 | 34 | 281,9>254,1 (10) | 281,9>160,0 (24) |
| Picloram | ESI (+) | 2,43 | 30 | 240,8>222,8 (12) | 240,8>167,8 (30) |
| Profenofós | ESI (+) | 9,36 | 36 | 372,8>302,7 (18) | 372,8>344,8 (14) |
| spinetoram | ESI (+) | 8,36 | 25 | 748,5>142,2 (30) | 748,5>98,1 (35) |
| Spinosad A | ESI (+) | 7,58 | 40 | 732,6>142,1 (30) | 732,6>98,1 (35) |
| Spinosad D | ESI (+) | 8,11 | 20 | 746,5>142,0 (30) | 746,5>98,0 (35) |
| Spiromesifen | ESI (+) | 11,15 | 20 | 371,1>273,1 (5) | 371,1>255,1 (25) |
| Tebuconazol | ESI (+) | 7,45 | 35 | 308,2>70,1(20) | 308,2>125,0 (35) |
| Triadimefon | ESI (+) | 6,44 | 30 | 294,1>197,2(15) | 294,1>69,3(20) |
| Triadimenol | ESI (+) | 6,46 | 20 | 296,1>70,2 (10) | 296,1>227,1 (10) |
| Trifloxistrobina | ESI (+) | 9,41 | 34 | 409,1>186,1 (16) | 409,1>145,2 (40) |

Optimización de la preparación de muestras

Para evaluar cuál de los tres métodos QuEChERS presentaron las mejores recuperaciones para los analitos evaluados, se utilizaron muestras blanco de gulupa. La evaluación se realizó dopando un blanco matriz por triplicado a una concentración de 30 µg/kg. La Figura 8 muestra los resultados.

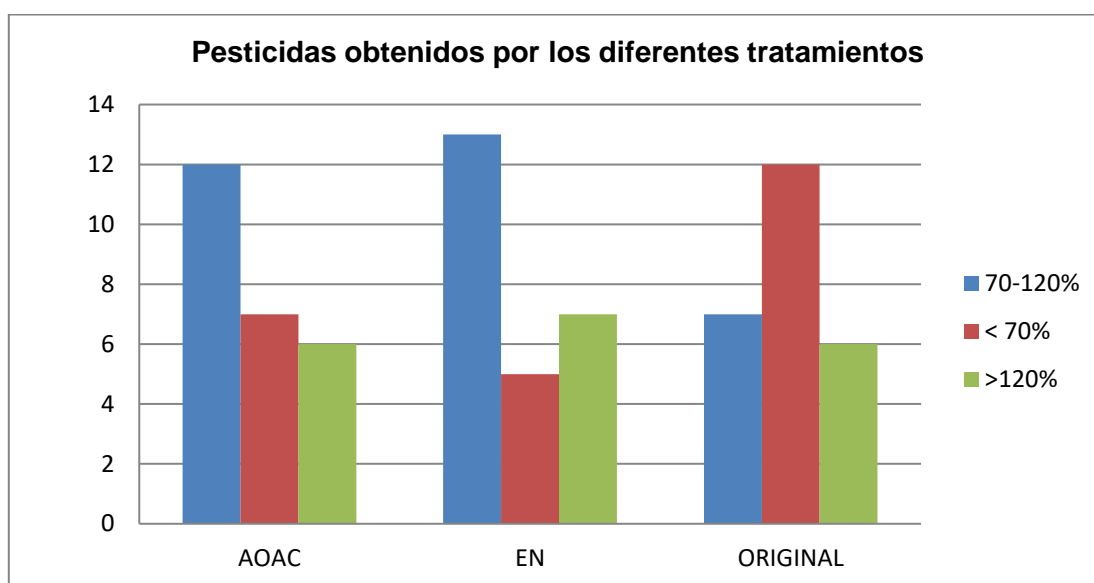


Figura 8. Número de pesticidas obtenidos con cada método QuEChERS sin limpieza.

Al comparar las tres versiones del método QuEChERS, se observó que los resultados fueron similares. Las mejores recuperaciones fueron obtenidas con los ensayos E2 y E3, con el E2 se obtiene el 68 % de los compuestos en los niveles de recuperación adecuados (Hollosi, Bousova, & Godula, 2013, 6), mientras que el E3 mostró resultados satisfactorios para el 72% de los compuestos. Las excepciones se mostraron para cyromacine, picloram y 2,4 D los cuales se consideran inestables por sufrir fotodegradación (Burrows, Canle, Santaballa, & Steenken, 2002, 88,98), en el

caso de la abamectina autores como Martínez-Soria discuten su degradación específicamente su fotosensibilidad (Lagunas-Allué et al., 2010; Lassalle et al., 2014)

Los resultados para E3 pueden ser explicados por la acidez de la matriz de gulupa (pH de aproximadamente 3,5) lo que dificulta la extracción de algunos analitos susceptibles al pH ácido, por lo cual tener un efecto tamponante (aumentar el pH) como lo ofrece el método europeo mejora dicha recuperaciones. En el E3 la mezcla de Citrato de Sodio dihidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) y Citrato de Sodio sesquihidrato ($C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1,5H_2O$) eleva el pH a valores entre 5,0 y 5,5 lo que facilita la extracción de compuestos susceptibles a pH bajos (Lehotay et al., 2005, 621-624; Osmar D Prestes, Friggi, Adaime, & Zanella, 2009, 1623-1624).

Adicional a la etapa de extracción debe tenerse en cuenta la etapa de limpieza con el fin de eliminar el exceso de agua y contaminantes no deseados de las muestras extraídas, ya que son extractos muy pigmentados, y la presencia de agentes coextractivos puede afectar la respuesta en el sistema cromatográfico. Además, pueden ser necesarios mantenimientos técnicos más frecuentes en el equipo. De esta forma, la limpieza de los extractos se vuelve importante con el fin de promover robustez y confiabilidad de los resultados. Varios investigadores han demostrado que aumentando la eficiencia de la etapa de limpieza, el efecto de la matriz se reduce (Ahumada & Zamudio, 2011, 233-234).

Para la optimización de la etapa de limpieza fue necesario emplear los sorbentes C18, PSA y carbón grafitizado.

La gulupa contiene 0,5% de grasa, en su totalidad proveniente de la cascara y las semillas (Orjuela Baquero et al., 2011, 9). De este modo fue necesario el uso de

C18 para eliminar de forma eficaz los interferentes apolares, como por ejemplo lípidos y esteroides (Lehotay & Mastovska, 2005, 633). Además, este agente limpiador ayuda en la remoción de almidón y azúcar de algunas muestras.

El uso de PSA en la etapa de limpieza es esencial, pues la gulupa presenta el 11,0 % de carbohidratos (Jiménez et al., 2011, 1914). El sorbente PSA puede remover ácidos grasos, azúcares, algunos pigmentos y otros compuestos que forman enlaces de hidrógeno (Osmar Damian Prestes, Adaime, & Zanella, 2011, 56).

La gulupa también contiene en su composición un 15% de antocianinas (Jiménez et al., 2011, 1914) y un 0,2% de carotenoides (pigmentos). Por ello utilizar carbón grafitizado es necesario con el fin de reducir el contenido de pigmentos responsables del color morado de la gulupa en su cascara y del color amarillo en su pulpa y también ayuda en la remoción de otros compuestos coextrativos apolares (Lehotay et al., 2005, 628) en la figura 9 se muestra el resultado de la utilización de los diferentes agentes de limpieza tanto en la cascara como en la pulpa.

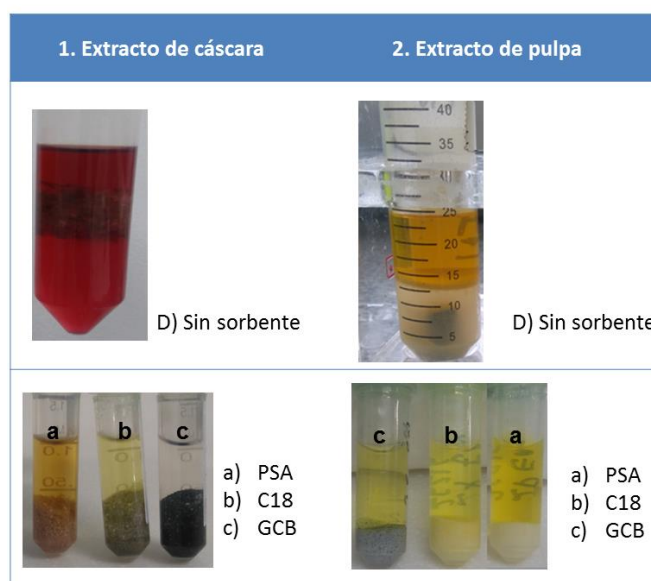


Figura 9. Representación de la etapa de limpieza: 1) extracto de cascara; 2) extracto de pulpa, a-con PSA b- C18, c-GCB y d- sin sorbente.

Validación del método de QUEChERS citrato optimizado

El método optimizado fue validado de acuerdo con la guía de SANTE 11975/2015. La validación del método QuEChERS fue realizada utilizando UPLC-MS/MS, siguiendo el procedimiento descrito en la Figura 10 y para los pesticidas mostrados en la tabla 11. Todas las soluciones analíticas empleadas en esta validación fueron preparadas en solvente orgánico (acetonitrilo) y en el extracto blanco de la matriz gulupa.

De este modo, fue posible evaluar: selectividad, efecto de la matriz, linealidad y rango de trabajo, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), exactitud precisión (repetibilidad y precisión intermedia) y robustez.

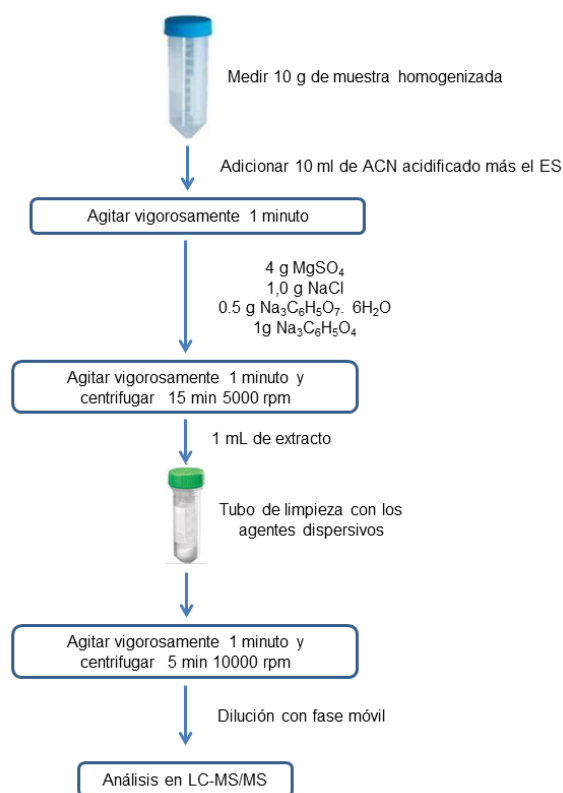


Figura 10. Representación del método QuEChERS citrato propuesto para la extracción de pesticidas en gulupa.

Selectividad

La selectividad del método fue garantizada, ya que no hay interferentes con los iones de cuantificación y confirmación en los tiempos de retención de cada plaguicida en las muestras "blanco" sin dopar. Como en la matriz no se identificó la presencia de ningún residuo de plaguicida por encima del mismo, LOD del método, las muestras evaluadas fueron utilizadas en la construcción de la curva analítica y en los ensayos de dopaje.

Linealidad, Rango de trabajo y Efecto Matriz

Los coeficientes de determinación para las curvas preparadas en solvente y extracto blanco de matriz, así como el efecto de matriz se presentan en la Tabla 12. El efecto de matriz también se puede observar en la Figura 11.

Los compuestos 2,4 D, boscalid y ciromacine no alcanzaron el coeficiente de determinación necesario cuando se evaluaron en relación con la curva preparada en el solvente. Así, obligatoriamente, estos compuestos se cuantifican a través de la curva preparada en la matriz. Los compuestos spiromesifen y boscalid podrían ser cuantificados por la curva preparada en solvente, ya que presentan menos del 5% de efecto matriz. Sin embargo, los coeficientes de determinación en curva preparada en el solvente no fueron considerados ideales y, por lo tanto, todas las cuantificaciones se realizaron a través de la curva preparada en extracto blanco de matriz. En el caso de compuestos como abamectina la cual no cumple criterio de linealidad (coeficiente de determinación y residuales menores al 20%) y el picloram el cual no se observa, se decide no tórnelos en cuenta en el resto de los parámetros.

Tabla 12. Coeficientes de determinación para curvas preparadas en solvente y extracto blanco de matriz y efecto matriz obtenidos para los compuestos en estudio.

| Compuesto | Curva en solvente | Curva en matriz | Efecto matriz (%) |
|------------------|-------------------|-----------------|-------------------|
| 2,4 D | 0,8234 | 0,9691 | -29 |
| Abamectin | 0,8998 | 0,8457 | 16 |
| Azoxistrobin | 0,9980 | 0,9995 | -14 |
| Boscalid | 0,9141 | 0,9872 | 1 |
| Cimoxanil | 0,9840 | 0,9414 | 32 |
| Ciromacine | 0,8965 | 0,9637 | -49 |
| difenoconazole | 0,9991 | 0,9996 | -12 |
| Etofenprox | 0,9966 | 0,9989 | 11 |
| Etoprofós | 0,9973 | 0,9987 | -4 |
| Fenhexamide | 0,9958 | 0,9986 | 7 |
| Fipronil | 0,9998 | 0,9992 | -13 |
| Linuron | 0,9976 | 0,9980 | -11 |
| Malation | 0,9944 | 0,9986 | -13 |
| metamidofos | 0,9971 | 0,9984 | -20 |
| metomil | 0,9971 | 0,9978 | -22 |
| Miclobutanil | 0,9950 | 0,9971 | -20 |
| Ofurace | 0,9983 | 0,9987 | -14 |
| Picloram | N.D | N.D | - |
| Profenofós | 0,9978 | 0,9970 | -3 |
| spinetoram | 0,9995 | 0,9999 | -17 |
| Spinosad A | 0,9989 | 0,9997 | -15 |
| Spinosad D | 0,9991 | 0,9993 | -13 |
| Spiromesifen | 0,9491 | 0,9967 | 1 |
| Tebuconazol | 0,9997 | 0,9993 | -2 |
| Triadimefon | 0,9981 | 0,9997 | -20 |
| Triadimenol | 0,9967 | 0,9996 | 8 |
| Trifloxistrobina | 0,9966 | 0,9992 | -9 |

El efecto matriz causado por la influencia de compuestos que se coextraen y están presentes en el extracto blanco varió de -49% para ciromacine a 32% para cimoxanil. Todos los compuestos de interés presentaron efecto matriz, sin embargo según lo valores este puede considerarse leve. Para algunos compuestos, el efecto matriz quedó en el rango entre -20 y + 20%, y otros excedieron estos límites. De esta manera

analizando los coeficientes de determinación y el efecto matriz se decide emplear la curva en el extracto de matriz para la validación debido a que esto permite analizar un mayor número de compuestos.

Algunos autores discuten estos rangos de porcentaje para lo cual valores EM (%) por debajo del 0% indican la supresión de la señal, cuando los valores superan el 0% hay un aumento en la señal. Los valores EM (%) entre -20% y 20% se consideran una supresión de señal leve (-20 a 0%) o aumento mínimo (0-20%), y valores entre -50% y -20% o 20%-50% se consideran efecto medio, mientras que los valores de EM por debajo del -50% o por encima del 50% se consideran como un fuerte efecto matriz (Mantzou, Karakitsou, Zioris, & Konstantinou, 2014, 1575)

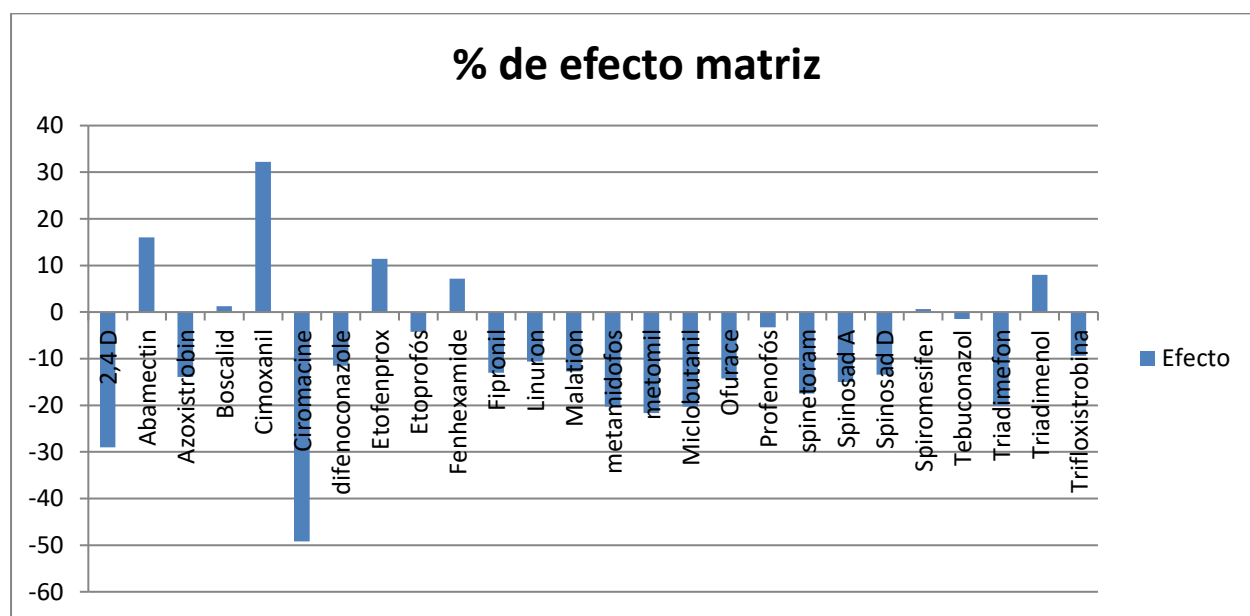


Figura 11. Efecto matriz para los analitos evaluados.

Exactitud y precisión

El método validado proporcionó resultados satisfactorios de recuperaciones (70 - 120%) y precisión ($CV \leq 20\%$) para algunos de los compuestos, en todos los niveles de fortificación (10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Para los ensayos de repetibilidad y de precisión intermedia, las recuperaciones variaron de 70 a 114%, con CV de 1 a 20% y 2 a 20%, respectivamente, conforme Tabla 13. En los ensayos, 2,4D, ciromacine, presentaron recuperaciones entre 30 y 57% en todos los niveles. Este comportamiento puede ser explicado debido a la tendencia de estos compuestos a la fotodegradación (Burrows et al., 2002, 88,98; Lagunas-Allué et al., 2010; Lassalle et al., 2014).

(Botero-Coy, Marín, Ibáñez, Sancho, & Hernández, 2012, 2303-2305) obtuvieron resultados similares para la determinación de residuos de plaguicidas en futas tropicales por LC-MS. Sin embargo, los autores obtuvieron una recuperación menor para metamidofos (53,6%), en comparación con las recuperaciones obtenidas en el presente trabajo (75 a 86%). Además, los autores tuvieron problemas con los compuestos 2,4 D y picloram que no pudieron ser validados debido a la superposición con compuestos provenientes de la matriz de igual manera que este trabajo.

En otro estudio, publicado en 2011, utilizando el método QuEChERS acetato y citrato (Waters corporation, 2011, 4) para la determinación de pesticidas en frutas por LC-MS/MS y GC-MS/MS, obtuvieron recuperación semejantes para Metamidofos, metomil y tebuconazole como es el caso de este estudio.

Los valores de LMR establecidos o adoptados para la gulupa varían de 0,01 a 0,5 mg kg^{-1} de acuerdo con la legislación europea, pero al no presentarse regulados en nuestro país tendrían todos los compuestos evaluados un valor de 0,01 mg/kg . Por

lo tanto, como el LDQm experimental (0,010 mg/kg) obtenido en este trabajo cumple con los LMR estipulados para estos compuestos, con la excepción de algunos cuyos LMR son mayores a los evaluados en este trabajo como es el caso de cimoxanil y linuron entre otros, cuyo valor es mayor al establecido en este método (0,02 mg kg⁻¹, 0,05 mg/kg respectivamente según la Unión Europea), con base en estos el método propuesto es adecuado para el tratamiento y seguimiento de los compuestos evaluados.

Tabla 13. Resultados de recuperación (R) y CV para los ensayos de repetibilidad y precisión intermedia realizados en cascara en los diferentes niveles de dopaje.

| Compuesto | Niveles de repetibilidad (µg/kg) | | | Precisión interm. (µg/kg) | | |
|---------------|----------------------------------|--------|--------|---------------------------|--------|-------|
| | 10 | 50 | 100 | 10 | 50 | 100 |
| | R±CV (%) | | | R±CV (%) | | |
| 2,4 D | 57±6 | 52±3 | 50±2 | 28±6 | 19±4 | 50±2 |
| Azoxistrobina | 86±9 | 81±2 | 87±4 | 98±16 | 90±4 | 87±4 |
| Boscalid | 97±8 | 115±1 | 88±7 | 85±9 | 90±8 | 88±7 |
| Cimoxanil | 75±18 | 7911 | 89±10 | 117±8 | 89±15 | 99±10 |
| Ciromacine | 23±9 | 37±3 | 58±7 | 37±18 | 49±10 | 68±7 |
| Difenoconazol | 98±14 | 103±4 | 94±4 | 114±5 | 87±11 | 94±4 |
| Etofenprox | 111±9 | 99±4 | 80±4 | 98±6 | 95±12 | 80±4 |
| Etoprofós | 99±6 | 103±8 | 91±2 | 117±9 | 112±16 | 91±2 |
| Fenhexamide | 83±16 | 97±4 | 87±14 | 82±5 | 83±15 | 87±14 |
| Fipronil | 92±5 | 88±4 | 93±5 | 115±9 | 74±3 | 93±5 |
| Linuron | 100±11 | 115±4 | 73±7 | 85±4 | 113±16 | 73±7 |
| Malation | 87±12 | 80±17 | 89±12 | 115±16 | 98±17 | 89±12 |
| metamidofos | 109±20 | 100±12 | 99±11 | 75±11 | 88±8 | 99±11 |
| metomil | 99±14 | 90±15 | 113±20 | 101±12 | 117±4 | 93±7 |
| Miclobutanil | 97±5 | 88±8 | 87±5 | 72±20 | 113±11 | 87±5 |

| | | | | | | |
|------------------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|
| Ofurace | 101±4 | 111±3 | 91±4 | 105±14 | 104±6 | 91±4 |
| Profenofós | 106±8 | 100±3 | 89±5 | 102±4 | 88±8 | 89±5 |
| spinetoram | 87±20 | 71±14 | 88±20 | 72±14 | 102±20 | 95±15 |
| Spinosad A | 98±8 | 94±16 | 78±20 | 76±6 | 98±7 | 91±7 |
| Spinosad D | 118±6 | 83±2 | 81±15 | 111±8 | 105±16 | 81±15 |
| Spiromesifen | 79±9 | 77±3 | 70±12 | 79±17 | 107±13 | 70±12 |
| Tebuconazol | 103±9 | 94±14 | 88±10 | 110±9 | 103±9 | 88±10 |
| Triadimefon | 97±8 | 93±2 | 93±4 | 94±8 | 84±16 | 93±4 |
| Triadimenol | 93±10 | 72±7 | 98±9 | 72±9 | 91±16 | 98±9 |
| Trifloxistrobina | 97±10 | 88±6 | 83±8 | 113±10 | 110±13 | 83±8 |

Límite de detección y límite de cuantificación

Con excepción del 2,4 D, picloram, ciromacine y abamectina, que presentaron bajas recuperaciones y poca linealidad, el LOQ del método, establecido como el menor nivel de dopaje que proporcionó resultados adecuados en la validación, fue de 10 µg/kg. El LOD del método corresponde a 3 µg/kg. Valores que pueden ser comparables con los encontrados por (Botero-Coy et al., 2012).

Robustez

Para esta determinación se aplica el Test de **Youden y Steiner** (Inglot, Gumieniczek, Paulina, & Rutkowska, 2013, 18, 20) para la evaluación de la robustez de un método analítico. Este procedimiento permite evaluar el efecto de ciertas variaciones y evaluar la respuesta en términos de recuperación obtenida con ellas, todo esto en un diseño

preestablecido (Logoyda et al., 2017, 189-190). Las variaciones que se tuvieron en cuenta son las siguientes:

A: no acidificación del solvente; B: Temperatura del horno modificada de 25 a 40°C; C: fase móvil la cual se cambia según la tabla 8, donde + indica que este parámetro cambia por la variación y – significa que se mantiene bajo las condiciones optimizadas.

Tabla 14. Resultados de robustez del método.

| Ensayo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|--|---|-------|-------|-------|------|-------|------|-------|
| Factor | | | | | | | | |
| A | - | + | - | + | - | + | - | + |
| B | - | - | + | + | - | - | + | + |
| C | - | - | - | - | + | + | + | + |
| Resultado para el método | 98,9 | 117,3 | 107,5 | 112,4 | 84,3 | 100,8 | 95,9 | 103,0 |
| Variación A | 11,73437486 | | | | | | | |
| Variación B | 4,376653725 | | | | | | | |
| Variación C | 13,035606 | | | | | | | |
| Repetibilidad del método $\times \sqrt{2}$ | 8,759903991 | | | | | | | |
| Concepto | <p style="text-align: center;">[Variación] > Repetibilidad Método *</p> <p style="text-align: center;">por lo tanto se concluye que el método no es robusto para las variables analizadas, solo es robusto para la variable B: temperatura.</p> | | | | | | | |

El método debe trabajarse exclusivamente con las variables establecidas en el procedimiento dadas en la Tabla 10, teniendo presente que puede soportar variaciones en la variable B que corresponde a temperatura de la columna como se aprecia en la tabla inmediatamente anterior, ya que dicha variación es la única que presenta un valor por debajo del parámetro de aceptación (Repetibilidad del método * Raíz de 2).

Aplicación del método

El método fue aplicado a 16 muestras de gulupa, siendo 3 adquiridas en cultivos orgánicos con seguimiento de BPA del municipio de Andes y 13 adquiridas en cultivos convencionales del municipio de Rionegro.

Entre las muestras analizadas, el 81,3% presentó residuos de uno o más analitos en el rango de concentración entre 14,89 a 783,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Analitos como trifloxistrobin, azoxistrobin y tebuconazol presentaron residuos por encima de los valores de LMR establecidos para gulupa (Tabla 2).

El fungicida asoxistrobin está presente en casi todas las muestras, en un rango de concentración entre 32,22 y 783,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$. difenoconazol y tebuconazol, ambos fungicidas, fueron encontrados en el 43,75% de las muestras en un rango de concentración de (40,70-282,30) y (32,09-191,05) $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente.

La mayoría de las plaguicidas se encontraron en las muestras de cultivo convencional, al no presentarse en las muestras orgánicas evidencia un buen manejo de BPA en las fincas respectivas. El asoxistrobin es un fungicida con LMR establecido en 0,05 mg/kg por la Unión Europea para el grupo de las pasifloras, sin embargo, este LMR no está disponible en el Codex Alimentarius o en la legislación colombiana, sin embargo la presencia de este compuesto en las muestras con valores que superan su límite hasta 15 veces su valor sugiere la necesidad de una reglamentación.

Conclusiones y recomendaciones

El método QuEChERS optimizado en este estudio mostró ser eficaz para la determinación de 22 plaguicidas del estudio en gulupa. El sistema UPLC-MS/MS con fuente ESI (+/-) proporcionó detección, selectividad y precisión satisfactorias. El método presentó recuperaciones adecuadas (84-106%) y CV (<20%) para todos los compuestos, excepto para 2,4D, picloram, boscalid, ciromacine, cymoxanil. Además de estos parámetros, la curva de calibración en matriz fue satisfactoria para la mayoría de los analitos, con valores de r^2 mayores que 0,95.

En relación con el efecto de la matriz que presenta la gulupa, se puede observar que hay una gran influencia en los plaguicidas evaluados, siendo fundamental la preparación de curvas analíticas en la matriz, a fin de disminuir el efecto de los compuestos que se coextraen y/o interferentes. La elección del sorbente para la etapa de limpieza se mostró esencial para mejorar las recuperaciones y disminuir el efecto de matriz causado por la presencia de pigmentos y coextractivos.

En el caso de los plaguicidas evaluados solamente difenoconazol, azoxistrobin, tebiconazol y trifloxistrobin estaban presentes en las muestras reales, cuyos valores sugiere la construcción de una regulación interna, pues la decisión de cuales plaguicidas evaluar en el estudio se basó en las entrevistas realizadas a los productores de esta fruta en las regiones estudiadas.

Considerando los pocos estudios existentes para el análisis de plaguicidas en gulupa, el método desarrollado demuestra ser una buena alternativa para el análisis multiresiduo en laboratorios de ensayo, ya que es un procedimiento simple y rápido. Especialmente cuando los trabajos realizados en el país se han desarrollado

especialmente por cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas (Bastidas, Guerrero, & Wyckhuys, 2013) o captura de electrones (Olivo- Taborda & Echeverri-Ruíz, 2016).

Sugerencias para trabajos futuros.

- Ampliar el número de plaguicidas para futuros análisis por UPLC-MS/MS.
- Desarrollar un método cromatográfico empleando GC-MS/MS para la determinación de residuos de plaguicidas en gulupa, que no son posibles por UPLC-MS/MS.
- Evaluar la aplicabilidad del método para el monitoreo de estos residuos en otras frutas exóticas.

Referencias

- Abián, J., Carrascal, M., & Gay, M. (2008). Introducción a la Espectrometría de Masas para la caracterización de péptidos y proteínas en Proteómica. *Proteómica*, 2, 17–31.
- Acción Global S.A. (2015). *Boletín Informativo*. Colombia. Retrieved from <http://www.accionglobal.net>
- Afify, A. E. M. R., Mohamed, M. A., El-gammal, H. A., & Attallah, E. R. (2010). Multiresidue method of analysis for determination of 150 pesticides in grapes using quick and easy method (QuEChERS) and LC-MS / MS determination. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 8(April), 602–606.
- Ahumada, D. A., & Zamudio, A. M. (2011). Análisis de residuos de plaguicidas en tomate mediante el uso de QuEChERS y cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas. *Revista Colombiana de Química*, 40, 227–245.
- Anastassiades, M., Scherbaum, E., & Mack, D. (2003). Implementation of the QuEChERS method for the routine analysis of pesticide residues - Validation and experiences.
- Antón, A., Juraske, R., Castells, F., Vijay, A., & Muñoz, P. (2009). Uptake and persistence of pesticides in plants : Measurements and model estimates for imidacloprid after foliar and soil application. *Journal of Hazardous Materials*, 165, 683–689. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.10.043>
- Arias, L. A., Bojacá, C. R., Ahumada, D. A., & Schrevens, E. (2014). Monitoring of pesticide residues in tomato marketed in bogota, colombia. *Food Control*, 35(1), 213–235. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.046>
- Arvand, M., Bozorgzadeh, E., & Shariati, S. (2013). Two-phase hollow fiber liquid phase microextraction for preconcentration of pyrethroid pesticides residues in some fruits and vegetable juices prior to gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31(2), 275–283. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.06.006>
- Asociación Nacional de Comercio Exterior, A. (2016). *Informe de exportaciones de gulupa 2016*.
- Balali-Mood, M., & Balali-Mood, K. (2008). Neurotoxic disorders of organophosphorus compounds and their managements. *Archives of Iranian Medicine*, 11(1), 65–89. <http://doi.org/http://dx.doi.org/08111/AIM.0015>
- Barro, R., Ares, S., Garcia-Jares, C., Llompарт, M., & Cela, R. (2004). Development of a sensitive methodology for the analysis of chlorobenzenes in air by combination of solid-phase extraction and headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1045(1-2), 189–196.

<http://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.033>

Bastidas, D., Guerrero, J., & Wyckhuys, K. (2013). Residuos de plaguicidas en cultivos de pasifloras en regiones de alta producción en Colombia. *Revista Colombiana de Química*, 42(2), 39–47.

Benítez, S. (2012). *Plaguicidas y efectos sobre la salud humana: un estado del arte*. (Asociación Española de toxicología., Ed.) (Vol. 1).

Bini Dhouib, I., Annabi, A., Jallouli, M., Marzouki, S., Gharbi, N., Elfazaa, S., & Lasram, M. M. (2016). Carbamates pesticides induced immunotoxicity and carcinogenicity in human: A review. *Journal of Applied Biomedicine*, 14(2), 85–90.
<http://doi.org/10.1016/j.jab.2016.01.001>

Botero-Coy, A. M., Marín, J. ., Ibáñez, M., Sancho, J. ., & Hernández, F. (2012). Multi-residue determination of pesticides in tropical fruits using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402, 2287–2310.

Buitrago, C. A., & Gómez, M. L. (2007). Uso aparente de plaguicidas en Colombia durante los años 2014-2007.

Burrows, H. D., Canle, M. L., Santaballa, J. A., & Steenken, S. (2002). Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 67, 71–108.

Bustos, M. (2012). Aplicación de LC-MS al análisis de residuos de plaguicidas. Colombia. <http://doi.org/10.13140/RG.2.1.2826.2241>

Cárdenas, O., Silva, E., & Ortiz, J. (2010). Uso de plaguicidas inhibidores de acetilcolinesterasa en once entidades territoriales de salud en Colombia , 2002-2005. *Biomedica*, 30, 95–106.

Celeiro, M., Llompарт, M., Lamas, J. P., Lores, M., Garcia-Jares, C., & Dagnac, T. (2014). Determination of fungicides in white grape bagasse by pressurized liquid extraction and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1343, 18–25. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.057>

Chang, P., Hsieh, M., & Chiu, T. (2016). Recent Advances in the Determination of Pesticides in Environmental Samples by Capillary Electrophoresis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(409), 1–20.
<http://doi.org/10.3390/ijerph13040409>

Chen, P.-S., Haung, W.-Y., & Huang, S.-D. (2014). Analysis of triazine herbicides using an up-and-down-shaker-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography. B*, 955-956, 116–123. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.02.032>

Choi, M., Lee, I.-S., & Jung, R.-H. (2016). Rapid determination of organochlorine pesticides in fish using selective pressurized liquid extraction and gas

- chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 205, 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.156>
- Chung, S. W. C., & Chen, B. L. S. (2011). Determination of organochlorine pesticide residues in fatty foods: A critical review on the analytical methods and their testing capabilities. *Journal of Chromatography A*, 1218(33), 5555–5567. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.066>
- Codex Alimentarius. (2004). Directrices Generales Sobre Muestreo CAC/GL 50-2004. Retrieved from <http://www.codexalimentarius.org/normas-oficiales/lista-de-las-normas/es/>
- Comite de Seguridad Alimentaria. (2012). *En buenos términos con la terminología*. Roma (Italia). Retrieved from <http://www.fao.org/>
- Commission, E. SANTE/11945/2015- Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. (2016).
- Cortes-Aguado, S., Sanchez-Morito, N., Arrebola, F., Garrido-Frenich, A., & Martinez-Vidal, J. . (2008). Fast screening of pesticide residues in fruit juice by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 107(3), 1314–1325. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.033>
- Dasika, R., Tangirala, S., & Naishadham, P. (2012). Pesticide residue analysis of fruits and vegetables. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 4(2), 19–28. <http://doi.org/10.5897/JECE11.072>
- de Souza Pinheiro, A., & de Andrade, J. B. (2009). Development, validation and application of a SDME/GC-FID methodology for the multiresidue determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. *Talanta*, 79(5), 1354–1359. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.06.002>
- Delgado-Zamarreño, M., Pérez-Martín, L., Bustamante-Rangel, M., & Carabias-Martínez, R. (2012). A modified QuEChERS method as sample treatment before the determination of isoflavones in foods by ultra-performance liquid chromatography – triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, 100, 320–328. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.070>
- Demoliner, A., Caldas, S. S., Costa, F. P., Gonçalves, F. F., Clementin, R. M., Milani, M. R., & Primel, E. G. (2010). Development and validation of a method using SPE and LC-ESI-MS-MS for the determination of multiple classes of pesticides and metabolites in water samples. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(8), 1424–1433. <http://doi.org/10.1590/S0103-50532010000800003>
- Domínguez, A. M., 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. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 74(2), 148–156. <http://doi.org/10.4067/S0718-58392014000200004>

- European Commission- SANTE. (2015). Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.
- FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (1999). Comisión del codex alimentarius: Manual de procedimiento. *Comisión Del Codex Alimentarius*.
- FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2006). *Seguridad alimentaria*.
- FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2011). Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. Informe resumido.
- Fernández, D. E. (2017). *Desarrollo de métodos analíticos basados en técnicas cromatográficas y espectrometría de masas para estudios de metabolómica de fármacos antitumorales de Pt en muestras biológicas*.
- Ferrer, C., Lozano, A., Agüera, A., Girón, A. J., & Fernández-Alba, A. R. (2011). Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7634–7639. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.033>
- García, J. E. (1998). Intoxicaciones agudas con plaguicidas: costos humanos y económicos. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 4(6), 383–387. <http://doi.org/10.1590/S1020-49891998001200003>
- Gimenez, A., Puyuelo, B., & Medina, B. (2013). *Estudio de viabilidad y mercado para el desarrollo de criterios ecológicos para la implementación del ecoetiquetado*.
- Gold, L. S., Slone, T. H., Ames, B. N., & Manley, N. B. (2001). Pesticide Residues in Food and Cancer Risk: A Critical Analysis. In *Handbook of Pesticide Toxicology* (segunda, pp. 799–843). <http://doi.org/10.1016/B978-012426260-7.50041-0>
- Grimalt, S., & Dehouck, P. (2016). Review of analytical methods for the determination of pesticide residues in grapes. *Journal of Chromatography A*, 1433, 1–23. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.076>
- He, Z., Wang, L., Peng, Y., Luo, M., Wang, W., & Liu, X. (2015). Multiresidue analysis of over 200 pesticides in cereals using a QuEChERS and gas chromatography – tandem mass spectrometry-based method. *FOOD CHEMISTRY*, 169, 372–380. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.102>
- Heidari, H., & Razmi, H. (2012). Multi-response optimization of magnetic solid phase extraction based on carbon coated Fe₃O₄ nanoparticles using desirability function approach for the determination of the organophosphorus pesticides in aquatic samples by HPLC–UV. *Talanta*, 99, 13–21. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.04.023>
- Hercegová, A., Dömötöróvá, M., Kružlicová, D., & Matisová, E. (2006). Comparison of sample preparation methods combined with fast gas chromatography - Mass

- spectrometry for ultratrace analysis of pesticide residues in baby food. *Journal of Separation Science*, 29(8), 1102–1109. <http://doi.org/10.1002/jssc.200500422>
- Hernández, A. F., Parrón, T., Tsatsakis, A. M., Requena, M., Alarcón, R., & López-Guarnido, O. (2013). Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. *Toxicology*, 307, 136–145. <http://doi.org/10.1016/j.tox.2012.06.009>
- Hollosi, L., Bousova, K., & Godula, M. (2013). Validation of the method for determination of pesticide residues by Gas Chromatography – Triple-Stage Quadrupole Mass Spectrometry.
- Hussain, Z., & Siddique, S. (2010). Determination of Pesticides in Fruits and Vegetables using Acetonitrile Extraction and GC / MS Technique. *Journal of Scientific Research*, (2), 20–29.
- Ibañez, M. (2007). *Potencial de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de para la elucidación, cuantificación y confirmación de plaguicidas y productos de transformación en muestras ambientales*. Universitat Jaume I.
- ICA. (2011). Estadísticas de comercialización de plaguicidas químicos de uso agrícola.
- Infoagro. (2017). Límite máximo de residuos (LMRs) permitidos en frutos de la pasión. Retrieved from www.infoagro.com
- Inglot, T., Gumieniczek, A., Paulina, M., & Rutkowska, E. (2013). New HPLC method with experimental design and fluorescence detection for analytical study of antihypertensive mixture, amlodipine and valsartan. *American Journal of Analytical Chemistry*, 4, 17–23.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (1997). Resolución 1023- por la cual se dictan disposiciones sobre la distribución, comercialización y venta de insumos agropecuarios, material genético animal y semillas para siembra. Colombia, Colombia.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2003). Resolución 3759-Por la cual se dictan disposiciones sobre el registro y control de los plaguicidas químicos de uso agrícola. Colombia, Colombia.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2017). *Listado de registros de uso directo de plaguicidas químicos de uso agrícola*. Bogota. Retrieved from <https://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Regulacion-y-Control-de-Plaguicidas-Quimicos.aspx>
- ISO, & IEC. Requisitos Generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración. Norma NTC-ISO-IEC-17025:2005, International Organization for Standardization (2005).
- Jiménez, M., Sierra, C., Rodríguez, F., González, M., Heredia, F., & Osorio, C. (2011). Physicochemical characterisation of gulupa (*Passiflora edulis* Sims . fo *edulis*)

- fruit from Colombia during the ripening. *Food Research International*, 44, 1912–1918. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.007>
- Jiménez Venegas, L., Quilodrán Peredo, J., Miranda Olivares, J. P., & Rodríguez Bustos, H. (2008). Efecto de dosis única intraperitoneal de cipermetrina en la corteza cerebral somatosensorial de ratones CF- 1. *International Journal of Morphology*, 26(1), 19–26. <http://doi.org/10.4067/S0717-95022008000100003>
- Kemmerich, M., Rizzetti, T. M., Adaime, M. B., Zanella, R., Martins, M., & Prestes, O. (2014). Optimization by central composite design of a modified QuEChERS method for extraction of pesticide multiresidue in Sweet Pepper and analysis by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 1–12. <http://doi.org/10.1007/s12161-014-9951-2>
- Kouzayha, A., Rabaa, A. R., Iskandarani, M. Al, Beh, D., Jaber, F., & Budzinski, H. (2012). Multiresidue method for determination of 67 pesticides in water samples using Solid Phase Extraction with centrifugation and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *American Journal of Analytical Chemistry*, 3, 257–265. <http://doi.org/10.4236/ajac.2012.33034>
- Lagunas-Allué, L., Martínez-Soria, M.-T., Sanz-Asensio, J., Salvador, A., Ferronato, C., & Chovelon, J. M. (2010). Photocatalytic degradation of boscalid in aqueous titanium dioxide suspension: Identification of intermediates and degradation pathways. *Applied Catalysis B: Environmental*, 98(3), 122–131. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2010.05.020>
- Lassalle, Y., Kinani, A., Rifai, A., Souissi, Y., Clavaguera, C., Bourcier, S., ... Bouchonnet, S. (2014). UV-visible degradation of boscalid – structural characterization of photoproducts and potential toxicity using in silico tests. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 28(10), 1153–1163. <http://doi.org/10.1002/rcm.6880>
- Lee, S., McLaughlin, R., Harnly, M., Gunier, R., & Kreutzer, R. (2014). Community Exposures to Airborne Agricultural Pesticides in California : Ranking of Inhalation Risks. *Environmental Health Perspectives*, 110(12), 1175–1184.
- Lehotay, S., & Mastovska, K. (2005). Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *Journal of AOAC International*, 88(2), 630–638.
- Lehotay, S., Mastovska, K., & Lightfield, A. (2005). Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *Journal of AOAC International*, 88(2), 615–629.
- Lesmes-Fabian, C., García-Santos, G., Leuenberger, F., Nuyttens, D., & Binder, C. R. (2012). Dermal exposure assessment of pesticide use: The case of sprayers in potato farms in the Colombian highlands. *Science of the Total Environment*, 430, 202–208. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.019>

- Li, X., Gan, P., Peng, R., Huang, C., & Yu, H. (2010). Determination of 23 organophosphorous pesticides in surface water using SPME followed by GC-MS. *Journal of Chromatographic Science*, 48(3), 183–187.
- Logoyda, L., Kondratova, Y., Korobko, D., Susla, O., Soroka, Y., Tsytsiura, R., & Pidruchna, S. (2017). Youden's test of the chromatographic determination of captopril in pharmaceuticals. *International Journal of Green Pharmacy*, 11(3), 188–191.
- Maki Diaz, G. (2014). *Tendencias de producción y comercialización de nopalito de exportación, calidad y manejo postcosecha*.
- Mantzou, N., Karakitsou, A., Zioris, I., & Konstantinou, I. (2014). QuEChERS and solid phase extraction methods for the determination of energy crop pesticides in soil, plant and runoff water matrices. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 93(15), 1566–1584. <http://doi.org/10.1080/03067319.2013.803282>
- Martinez, J., & Garrido, A. (2006). *Pesticide protocols*. (J. Walker, Ed.). España: Humana Press. <http://doi.org/10.1385/1-59259-929-X>
- Maštovská, K., & Lehotay, S. J. (2004). Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. *Journal of Chromatography A*, 1040(2), 259–272. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.04.017>
- Ministerio del Medio Ambiente y de La Protección Social. (2007). Resolución 2906 por la cual se establecen los LMR en alimentos para consumo humano y en piensos o forrajes. Colombia, Colombia.
- Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Rural. Decreto 1843- por el cual se reaglamentan parcialmente los títulos III, V, VI, VII, y XI de la ley 9 de 1979 sobre el uso y manejo de plaguicidas (1991). Retrieved from <https://www.invima.gov.co/decretos-plaguicidas-uso-domestico/390-decreto-1843-julio-22-de-1991.html>
- Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Rural. (2015). Así es la oferta agropecuaria exportable de Colombia que conquistó Expo Milano 2015. Retrieved September 15, 2016, from <https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/Así-es-la-oferta-agropecuaria-exportable.aspx>
- Morillas, P. (2016). Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos- Una guía de Laboratorio para validación de métodos y temas relacionados. España: Euralab. España. Retrieved from www.eurachem.org
- Moura Andrade, G. C. ., Freguglia, R. M., Furlani, R. P. ., Torres, N., & Tornisielo, V. (2011). Determination of Pesticide Residues in Tomato using Dispersive Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography/Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(9), 1701–1708.
- Mughari, A. R., Vázquez, P. P., & Galera, M. M. (2007). Analysis of phenylurea and

- propanil herbicides by solid-phase microextraction and liquid chromatography combined with post-column photochemically induced fluorimetry derivatization and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 593(2), 157–163.
<http://doi.org/10.1016/j.aca.2007.04.061>
- Murcia, A. M., & Stashenko, E. (2008). Determinación de plaguicidas organofosforados en vegetales producidos en Colombia. *Agro Sur*, 36(2), 71–81.
- Muresan, C., Covaci, A., Socasi, S., Suharoschi, R., Tofana, M., Muste, S., & Pop, A. (2015). Influence of Meat Processing on the Content of Organochlorine Pesticides. *Journal of Food Processing & Technology*, 6(11). <http://doi.org/10.4172/2157-7110.1000517>
- Ocampo Perez, J., & Wyckhuys, K. (2012). *Tecnología para el cultivo de gulupa en Colombia*. (C. I. de A. T.-C. y M. de A. y D. R. Centro de Bio-sistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, Ed.). Bogotá.
- Olivo-Taborda, 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.
<http://doi.org/https://doi.org/10.15446>
- Orjuela Baquero, N. M., Moreno Chacón, L., Hernández, M. S., & Melgarejo, L. M. (2011). Caracterización fisicoquímica de frutos de gulupa (*Passiflora edulis Sims*) bajo condiciones de almacenamiento. In *Poscosecha de la gulupa (Passiflora edulis Sims)* (pp. 33–44). Colombia. Retrieved from http://www.bdigital.unal.edu.co/8532/6/05_Cap03.pdf
- Pareja, L., Niell, S., Vryzas, Z., González, J., Verónica, M., Mourkidou, E. P., & Heinzen, H. (2015). Comparison and evaluation of two methods for the pesticide residue analysis of organophosphates in yerba mate. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(2), 98–104. <http://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.02.001>
- Perez, M. A., Navarro, H., & Miranda, E. (2013). Residuos de plaguicidas en hortalizas: problemática y riesgo en Mexico. *Revista. Internacional de Contaminantes Ambientales*, 29, 45–64.
- Pestana, D., Teixeira, D., Faria, A., Domingues, V., Monteiro, R., & Calhau, C. (2012). Effects of Environmental Organochlorine Pesticides on Human Breast Cancer: Putative Involvement on Invasive Cell Ability. *Environmental Toxicology*, 168–176.
<http://doi.org/10.1002/tox.21882>
- Pintado-Herrera, M. G., González-Mazo, E., & Lara-Martín, P. A. (2016). In-cell clean-up pressurized liquid extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry determination of hydrophobic persistent and emerging organic pollutants in coastal sediments. *Journal of Chromatography A*, 1429, 107–118.
<http://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.040>
- Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of Liquid Chromatography- Mass

Spectrometry. *Clinical Biochemistry*, 30(February), 19–34.

- Prestes, O. D., Adaime, M. B., & Zanella, R. (2011). QuEChERS : possibilities and trends in sample preparation for multiresidue determination of pesticides in food. *Scientia Chromatographica*, 3(1), 51–64. <http://doi.org/10.4322/sc.2011.004>
- Prestes, O. D., Friggi, C. A., Adaime, M. B., & Zanella, R. (2009). QuEChERS- Um método moderno de preparo de amostra para determinacao multiresiduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados a espectrometria de masas. *Quimica Nova*, 32(6), 1620–1634.
- Queiroz, S., Lazou, K., Sandra, P., & Jardim, I. (2004). Determination of pesticides in water By Liquid Chromatography-(Electrospray Ionization)- Mass Spectrometry (LC-ESI-MS), 14, 53–60.
- Ramírez, J. a, & Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*, 4(2), 67–75. Retrieved from <http://www.scsmt.cat/Upload/TextCompleto/2/1/216.pdf>
- Rawn, D. F. K., Judge, J., & Roscoe, V. (2010). Application of the QuEChERS method for the analysis of pyrethrins and pyrethroids in fish tissues. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(6), 2525–2531. <http://doi.org/10.1007/s00216-010-3786-5>
- Rizzetti, T. M., Kemmerich, M., Martins, M. L., Prestes, O. D., Adaime, M. B., & Zanella, R. (2016). Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 196, 25–33. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.010>
- Salemi, A., Rasoolzadeh, R., Nejad, M. M., & Vosough, M. (2013). Ultrasonic assisted headspace single drop micro-extraction and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detector for determination of organophosphorus pesticides in soil. *Analytica Chimica Acta*, 769, 121–126. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2013.01.054>
- Santos, J. L., Aparicio, I., Alonso, E., & Callejón, M. (2005). Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors. *Analytica Chimica Acta*, 550(1-2), 116–122. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2005.06.064>
- Sapahin, H. A., Makahleh, A., & Saad, B. (2014). Determination of organophosphorus pesticide residues in vegetables using solid phase micro-extraction coupled with gas chromatography-flame photometric detector. *Arabian Journal of Chemistry*, 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.12.001>
- Shamsipur, M., Yazdanfar, N., & Ghambarian, M. (2016). Combination of solid-phase extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by GC-MS for determination of pesticide residues from water, milk, honey and fruit juice. *Food*

- Chemistry*, 204, 289–297. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.090>
- Sinha, S. N., Vasudev, K., & Vishnu Vardhana Rao, M. (2012). Quantification of organophosphate insecticides and herbicides in vegetable samples using the “quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe” (QuEChERS) method and a high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry (LC-MS/MS) t. *Food Chemistry*, 132(3), 1574–1584. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.102>
- Sivaperumal, P., Anand, P., & Riddhi, L. (2015). Rapid determination of pesticide residues in fruits and vegetables, using ultra-high-performance liquid chromatography / time-of-flight mass spectrometry. *FOOD CHEMISTRY*, 168, 356–365. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.072>
- Soloneski, S., Kujawski, M., Scuto, A., & Larramendy, M. L. (2015). Carbamates: A study on genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects induced in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Toxicology in Vitro*, 29(5), 834–844. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.03.011>
- Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2009). Aspectos prácticos de la ionización con electrones en la obtención de espectros de masas y su interpretación. *Scientia Chromatographica*, 1(4), 19–36.
- Torrado, A. (2005). Uso de plaguicidas y exigencias del mercado agroalimentario. Retrieved from http://www.ica.gov.co/getdoc/d3eecf95-6146-412b-be83-e1e507db9cd6/Articulo_UsodePlaguicidas.aspx
- Torrado Pacheco, A. (2005). *Buenas Prácticas Agrícolas. Sistema de aseguramiento de la inocuidad de los alimentos. Instituto Colombiano Agropecuario - ICA*. Retrieved from www.ica.gov.co
- Unión Europea. (2005). Regulation (EC) N° 396/2005 of the european parliament and of the council on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC.
- Waters corporation. (2011). *QuEChERS procedure for Multi-Residue pesticide Analysis* (No. 720003643EN). Milford.
- World Health Organisation. (2004). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification : 2004 .
- Wu, G., Bao, X., Zhao, S., Wu, J., Han, A., & Ye, Q. (2011). Analysis of multi-pesticide residues in the foods of animal origin by GC-MS coupled with accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography cleanup. *Food Chemistry*, 126(2), 646–654. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.105>
- Wu, L., Song, Y., Hu, M., Zhang, H., Yu, A., Yu, C., ... Wang, Z. (2015). Application of magnetic solvent bar liquid-phase microextraction for determination of organophosphorus pesticides in fruit juice samples by gas chromatography mass spectrometry. *FOOD CHEMISTRY*, 176, 197–204.

<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.055>

- Yang, X., Zhang, H., Liu, Y., Wang, J., Zhang, Y. C., Dong, A. J., ... Cui, J. (2011). Multiresidue method for determination of 88 pesticides in berry fruits using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry: Determination of 88 pesticides in berries using SPE and GC-MS. *Food Chemistry*, *127*(2), 855–865. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.024>
- Zhao, M., Feng, Y., Zhu, Y., & Kim, J. (2014). Multi-residue Method for Determination of 238 Pesticides in Chinese Cabbage and Cucumber by Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry: Comparison of Different Purification Procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*, 11449–11456.
- Zhao, X., Zhou, Y., Kong, W., Gong, B., Chen, D., Wei, J., & Yang, M. (2016). Multi-residue analysis of 26 organochlorine pesticides in *Alpinia oxyphylla* by GC-ECD after solid phase extraction and acid cleanup. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *1017-1018*, 211–220. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.03.009>
- Zhu, F., Xu, J., Ke, Y., Huang, S., Zeng, F., Luan, T., & Ouyang, G. (2013). Applications of in vivo and in vitro solid-phase microextraction techniques in plant analysis: A review. *Analytica Chimica Acta*, *794*, 1–14. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2013.05.016>